

低波数ラマン分光法を用いた難水溶性薬物の溶出及び結晶化過程のモニタ
リング

Monitoring Dissolution and Crystallization Processes of Poorly Water-Soluble
Drug Using Low Frequency Raman Spectroscopy

令和元年度入学

工藤 嵩之 (Kudo, Takayuki)

指導教員

深水 啓朗

本文中の用語は以下のように略記した。

AcOEt	: Ethyl Acetate
ART	: Artemisinin
CBZ	: Carbamazepine
Co-former	: Cocrystal Former
DSC	: Differential Scanning Calorimetry
HPMC	: Hydroxy Propyl Methyl Cellulose
JP2 nd	: 2 nd Fluid for Dissolution Test in Japanese Pharmacopoeia
LAG	: Liquid-Assisted Grinding
LF	: Low Frequency
LV	: Latent variable
MSC	: Multiplicative scatter correction
MeOH	: Methanol
NIPALS	: Nonlinear Iterative Partial Least Squares
NIR	: Near-infrared
ORC	: Orcinol
PAT	: Process Analytical Technology
PCA	: Principal Component Analysis
PLS	: Partial Least Squares
PLSR	: Partial Least Squares Regression
PM	: Physical Mixture
PXRD	: Powder X-ray Diffraction
RES	: Resorcinol
RMSEC	: Root Mean Square Error of Calibration
RMSECV	: Root Mean Square Error of Cross-validation

RMSEP	: Root Mean Square Error of Prediction
SCXRD	: Single Crystal X-ray Diffraction
SNV	: Standard Normal Variate
2MRE	: 2-Methyl Resorcinol

目次

緒言	3
第 1 章 ART 新規共結晶の溶出挙動モニタリング	6
第 1 節 ART の網羅的な共結晶スクリーニングと共結晶の特性解析	8
第 2 節 ART-2MRE 共結晶の単結晶 X 線構造解析 (SCXRD)	14
第 3 節 ART 共結晶の溶出挙動モニタリング	17
第 1 項 ART 共結晶の溶出試験	17
第 2 項 LF ラマン分光法による ART-2MRE 溶出挙動モニタリング ...	20
第 3 項 PXRD 測定による ART-2MRE 溶出挙動の評価	24
第 4 項 LF ラマン分光法による ART-RES 溶出挙動モニタリング	26
第 4 節 HPMC を含む試験液での ART 共結晶の溶出挙動モニタリング	28
第 1 項 HPMC を含む試験液での ART 共結晶の溶出試験	28
第 2 項 LF ラマン分光法による ART-2MRE 溶出挙動モニタリング ...	30
第 3 項 PXRD 測定による ART-2MRE 溶出挙動の評価	33
第 4 項 LF ラマン分光法による ART-RES 溶出挙動モニタリング	34
第 5 項 PXRD 測定による ART-RES 溶出挙動の評価	37
第 5 節 ART 共結晶からの溶解挙動の考察	39
第 6 節 小括	42
第 2 章 CBZ 結晶多形の溶解及び結晶化過程のモニタリング	43
第 1 節 メタノール中の懸濁液における CBZ 結晶多形	45
第 2 節 主成分分析 (PCA)	48
第 3 節 検量モデルの構築	49
第 4 節 検量モデルの評価	51
第 5 節 CBZ の溶解及び結晶化過程の定量評価	55
第 6 節 小括	57

総括	58
実験の部	60
引用文献	71
謝辞	74
論文目録	75

緒言

医薬品をその薬効成分の分子量の大きさに基づいて分類すると、主に有機合成技術をもとに製造される低分子医薬品、ペプチドや核酸などの中分子医薬品、抗体医薬品に代表される高分子医薬品が存在する。これら医薬品のモダリティは、従来中心であった低分子医薬品から疾患ニーズと創薬アプローチの変遷とともに変化してきており、2000年代よりタンパク質工学の進展を背景に抗体医薬品が発展し、さらに近年では中分子医薬品の研究開発が急速に進んでいる。しかしながら、経口投与が可能で製造コストが安価な低分子医薬品は依然として創薬において主要なモダリティの一つになっている¹⁾。経口投与の選択肢は低分子医薬品のメリットであるが、近年は低分子創薬のターゲットの減少による化学構造の複雑化と、薬理活性向上のための疎水性官能基の導入により、難水溶性薬物の割合が増加しており、有効成分の経口吸収性を向上させるための溶解性の改善が医薬品開発における重要課題となっている^{2),3)}。

難水溶性薬物の溶解性改善のアプローチの一つに、薬物分子の結晶形態を制御する結晶工学（クリスタルエンジニアリング）が挙げられる。クリスタルエンジニアリングとは、結晶を構成する分子の配列や分子間相互作用といった分子のパッキング状態を意図的に設計し、所望の固体物性特性（物理化学的性質、化学的性質等）を有する結晶をデザインする研究分野である。薬物単体からなる結晶多形（非晶質も含む）の制御⁴⁾あるいは塩や共結晶等の複合結晶化技術による制御を基軸としたアプローチであり、これにより原薬の溶解性や物理化学的性質を改善することが可能となる（図1）^{5),6)}。医薬品開発においては、薬物がとりうる複数の結晶形の中から、熱力学的に最も安定である結晶形（安定形）を原薬の開発形態として採用するのが一般的である^{7),8)}。準安定形は安定形よりもエネルギー的に

高い状態にあるため、溶解性には優れているが、物理的にも化学的にも不安定であり、保存等により安定な結晶に転移する可能性がある。このリスクを避けるためにも、安定形では溶解性が不足している場合は、準安定結晶よりも塩や共結晶などへ原薬形態を変更し、熱力学的に最安定な結晶形で開発する方が望ましい。

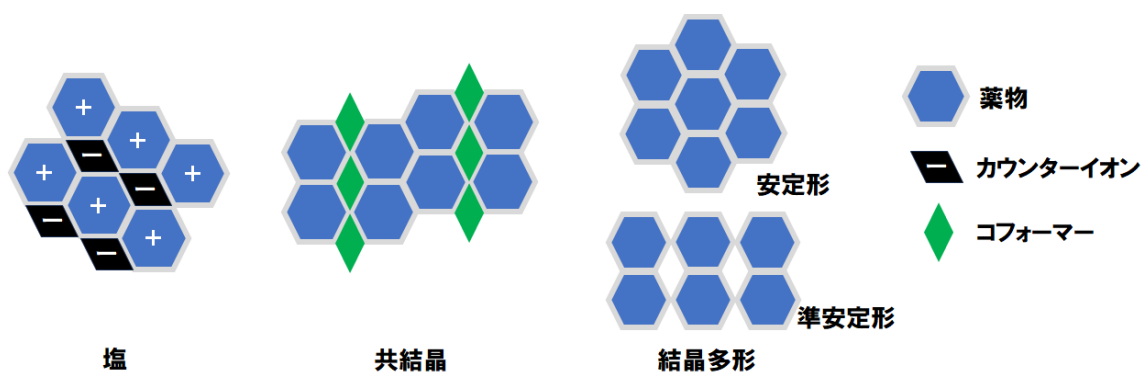


図 1 結晶工学で用いられる原薬形態の結晶格子内の模式図

原薬の結晶性を分析評価するための技術としては、粉末 X 線回折法が最も一般的であるが、赤外分光法、近赤外分光法、テラヘルツ分光法およびラマン分光法といった分光分析法も用いられる。特にラマン分光法はサンプル前処理不要、非破壊・非接触で測定可能という特徴を有する⁹⁾ことから、医薬品品質評価やプロセス分析技術ツールの 1 つとして注目されている。通常領域のラマン分光法 ($200 \sim 2000 \text{ cm}^{-1}$) は、官能基や分子構造の情報を高感度に得ることができ、それらの微小な環境変化の検出に有用である。一方で低波数 (LF) 領域のラマン分光法 ($5 \sim 200 \text{ cm}^{-1}$) は、結晶格子の振動や分子間振動 (水素結合、 π - π 相互作用) の情報に鋭敏であり、化学構造的には変わらない結晶多形の判別に最適な方法として注目されている¹⁰⁾。

そこで本研究では、難水溶性薬物の溶出及び結晶化過程のモニタリング

に LF ラマン分光法を適用し、その有用性について評価した。第 1 章では難水溶性薬物のアルテミシニンの共結晶について、共結晶スクリーニングで得られた新規共結晶に対して溶出試験を行い、共結晶からの薬物の溶出挙動を定性的に *in-situ* でモニタリングした。さらに、そこで得られた知見から、共結晶からの薬物の溶出過程を考察した。第 2 章ではカルバマゼピン (CBZ) をモデル化合物として、医薬品原薬の多形転移の過程を *in-situ* モニタリングし、結晶多形の識別を行った。さらに、LF ラマン分光法と多変量解析を組み合わせることで、原薬溶解過程及び結晶化工程中に各結晶多形の定量が可能なモデルの構築を試みた。

第 1 章 ART 新規共結晶の溶出挙動モニタリング

共結晶は、特定の化学量論比を有し非イオン相互作用によって構造が形成された多成分結晶と定義される¹¹⁾。医薬品の共結晶においては、原薬とコフォーマーと呼ばれる添加剤が水素結合等により結合した複合体結晶を指すことが多い。塩と異なり、ほとんどすべての原薬はかなりの水素結合部位を有するため、共結晶化する可能性がある^{12),13)}。共結晶は薬物単体からなる結晶とは異なる物理化学的性質を示すことから、物性改善の手段として多くの研究報告がなされてきた。特に難水溶性薬物に対して、水溶性のコフォーマーと組み合わせた共結晶化により、溶解度と溶解速度を増強する報告は多数なされてきた¹³⁾⁻¹⁵⁾。

アルテミシニン (ART) は、図 2 に示す化学式を有する中性化合物であり、中国の薬草であるクソニンジンから抽出された、現在の標準治療法の抗マラリア薬の一つである^{16),17)}。しかしながら、そのバイオアベイラビリティは 8~10%と報告されており¹⁸⁾、ART の低い水溶解性が経口吸収の弊害となっていることが推測されている。これらの問題を克服するために、artemether、arteether、dihydroartemisinin、artesunate、artelinate といった半合成誘導体が開発されている^{19),20)}。これら誘導体は加水分解に対する安定性が高く、毒性が低いという利点がある反面、半減期が短く、薬剤耐性があり、コストが高い^{20),21)}。したがって、ART のバイオアベイラビリティと有効性を増加するために、経口剤において必要な性質（特に溶解性と溶解速度）を有する、ART の新しい原薬形態を見出すことが課題となっている。

ART の化学構造にはイオン化部位がないため、報告されている ART の塩はない。Karki らは大規模な共結晶スクリーニングの中で、ART の 2 つの共結晶、すなわちオルシノール (ORC) との 1:1 の共結晶及びレゾルシノール (RES) との 2:1 の共結晶を見出した²²⁾。最近の *in vitro* 及び *in vivo*

試験により、これらの ART 共結晶は、ART の経口バイオアベイラビリティ増強に有望であることが示唆された^{23),24)}。同様の研究として、アセチレンジカルボン酸との 2:1 の共結晶も報告されている²⁵⁾。

薬物の経口吸収改善を目的とした共結晶を評価する上で、その溶解過程の理解は必須である。リアルタイムで薬物の共結晶の溶解過程をモニタリングする手法は、多くの報告がなされてきた²⁶⁾⁻²⁹⁾。共結晶の結晶状態の観点では、共結晶の生成や解離過程をモニタリングした報告は比較的多数なされている³⁰⁾⁻³²⁾。共結晶の溶解プロセスをその場でリアルタイムにモニタリングする報告はまだ限られている³³⁾が、最近ではフーリエ変換赤外分光イメージングを共結晶の溶解挙動の解析に応用する事例が報告されている³⁴⁾。しかしながら、局方で定められた溶出試験に近い条件で結晶状態をモニタリングした報告はほとんどない。共結晶からの溶出過程を正しく評価することができれば、コフォーマーの選定に有用であるのみならず、共結晶の製剤化時の評価にも重要な知見を与えることが期待される。

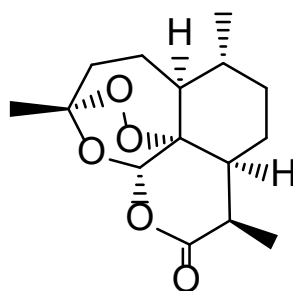


図 2 ART の化学構造式

第 1 節 ART の網羅的な共結晶スクリーニングと共結晶の特性解析

ART の共結晶スクリーニングは、原料として ART 安定形及び各種コフォーマーを使用し、溶媒としてエタノールまたは酢酸エチル (AcOEt) を添加した溶媒添加粉碎法 (Liquid-assisted grinding method、LAG) で実施した。

既知のレゾルシノールとの共結晶 ART-RES を参考にレゾルシノール骨格を有する化合物、人に毒性がない化合物、添加剤として使用実績がある化合物を含む様々な化学構造を有する表 1 に示した合計 83 種のコフォーマーを用いて ART との共結晶形成の可能性を網羅的に検討した。

スクリーニングの結果、新規の組み合わせである 2-メチルレゾルシノール (2-MRE) および既報の組み合わせであるレゾルシノール (RES) とオルシノール (ORC) の 3 種類において、ART およびコフォーマーに由来しない新規回折ピークを PXRD で確認した。スクリーニングで共結晶形成の可能性が示唆された 3 種のコフォーマーの構造式を図 3 に示す。

表 1 ART の共結晶スクリーニングに用いたコフォーマー

No.	Co-former	No.	Co-former
1	2,3-Dihydroxybenzoic acid	43	Malonic acid
2	2',4'-Dihydroxyacetophenone	44	Myristic acid
3	2',6'-Dihydroxyacetophenone	45	L-Malic acid
4	3',5'-Dihydroxyacetophenone	46	Resorcinol
5	4-Ethylresorcinol	47	Benzoic acid
6	4-Hydroxybenzoic acid	48	<i>trans</i> -Cinnamic acid
7	D-Glucono-1,5-lactone	49	Mucic acid
8	Adipic acid	50	Propyl gallate
9	L-Ascorbic acid	51	L-Tartaric acid
10	D-Araboascorbic acid	52	Hippuric acid
11	Isophthalic acid	53	<i>N</i> -acetyl glycine
12	Ursodeoxycholic acid	54	<i>N</i> -Methylglucamine
13	Oxyresveratrol	55	Allantoin
14	2-Oxoglutaric acid	56	Isonicotinamide
15	Orcinol	57	Glycolamide
16	Carminic acid	58	Creatinine
17	(+)-Camphoric acid	59	Saccharin
18	Xylitol	60	Diisopropanolamine
19	Citric acid	61	Taurine
20	Glycolic acid	62	Thiabendazole
21	Glutaric acid	63	L-Tyrosine
22	Gentisic acid	64	Tromethamine
23	Succinic acid	65	Nicotinamide
24	Salicylic acid	66	Betaine anhydrous
25	Phenyl salicylate	67	Phenacetin
26	Oxalic acid dihydrate	68	L-Proline
27	4,6-Dichloro-resorcinol	69	Benzamide
28	Sucralose	70	Lactamide
29	Potassium sorbate	71	Urea
30	Thymol	72	3-Hydroxyphenylurea
31	Decanoic acid	73	L-Theanine
32	4-Iodophenol	74	L-Valine
33	1-Hydroxy-2-naphthoic acid	75	2,4,6-Trihydroxybenzoic acid
34	Hydroquinone	76	1,3-Diphenylurea
35	Pyrogallol	77	2-Methylresorcinol
36	L-Pyroglutamic acid	78	<i>N</i> -Acetyl-DL- tryptophan
37	Phenol red	79	L-Histidine
38	Phthalic acid	80	L-Leucine
39	Fumaric acid	81	L-Methionine
40	Phloroglucinol dihydrate	82	DL-Mandelic acid
41	3- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisole	83	4,6-Diaminoresorcinol
42	Maleic acid		

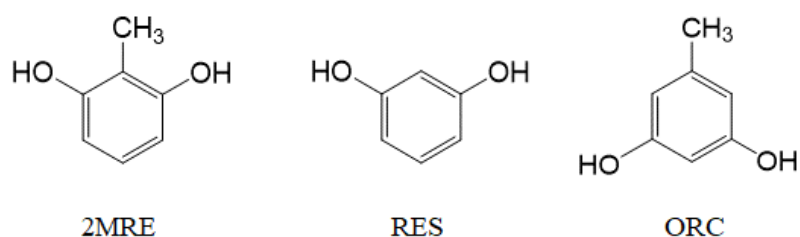


図3 スクリーニングで共結晶形成の可能性が示唆された
3 種のコフォーマーの構造式

LAG 法によるスクリーニングで共結晶形成の可能性が示唆された 3 種のコフォーマーのうち、2MRE または RES と ART との組み合わせについて、スケールアップを目的としてスラリー法を検討した。スラリー法は溶媒懸濁法とも呼ばれ、薬物とコフォーマーをそれぞれの飽和溶解度以上の濃度で溶媒に共に添加し、懸濁状態で共結晶の結晶化を促す方法である。ART と 2MRE または RES の組み合わせについて、水を溶媒としたスラリー法によって得られた結晶を粉末 X 線回折 (PXRD) 測定した。その結果を図 4 に示す。ART と 2MRE の組み合わせでのスラリーにより得られた結晶は、LAG 法と同一の回折ピークを認め、ART や 2MRE とは異なる回折ピークが認められたことから、共結晶の形成が示唆された。また、ART と RES の組み合わせでのスラリーにより得られた結晶は、既報の ART-RES 共結晶と同一の PXRD 回折パターンを示した。

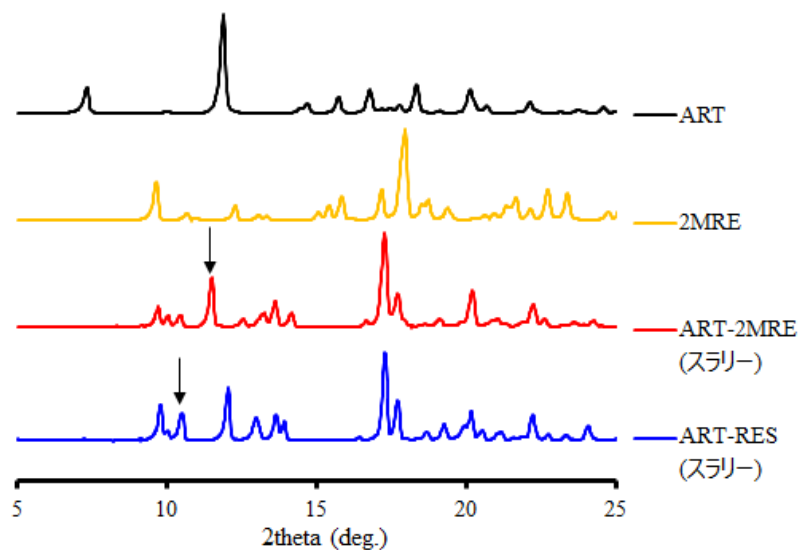


図 4 ART、ART-2MRE、2MRE、ART-RES、RES の PXRD 測定結果
(矢印は共結晶に特徴的なピーク)

新規の ART-2MRE 共結晶のキャラクタリゼーションを目的として、ART 安定形、2MRE、ART と 2MRE の物理的混合物 (Physical mixture、PM)、および ART-2MRE 共結晶に対して Differential Scanning Calorimetry (DSC) 測定を行った (図 5)。ART 安定形では、ART の融解に対応する明確な吸熱ピークが 154.1°C で観察された。一方で、ART-2MRE では共結晶の融解に起因する吸熱ピークが 132.5°C で観察され、共結晶形成による結晶内部の相互作用の変化が示された。ART と 2MRE の PM では、88.8°C に共晶融解に伴う吸熱ピークが観測され、その後 130.7°C に共結晶の融解に由来すると考えられるピークが観測され、共結晶の生成が示唆された。

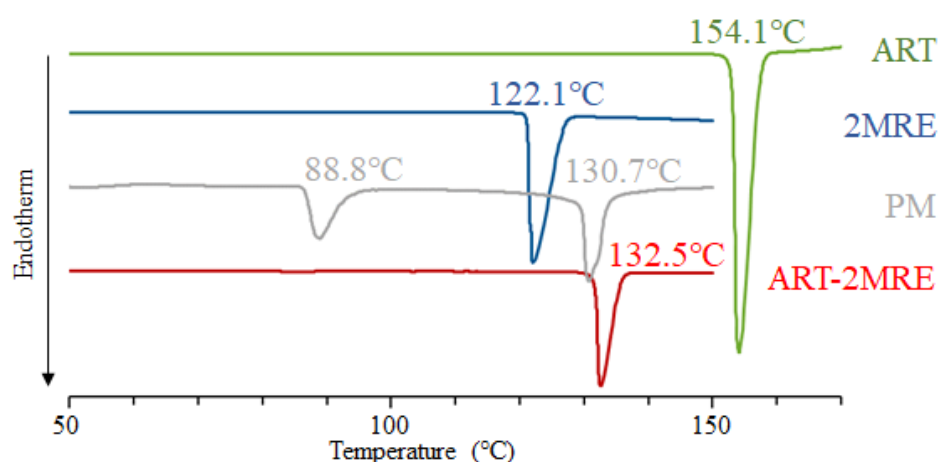


図 5 ART、2MRE、PM、ART-2MRE の DSC 曲線

新規の ART-2MRE 共結晶のキャラクタリゼーションと既報の ART-RES 共結晶との比較を目的として、ART (安定形)、ART-2MRE 共結晶、2MRE、ART-RES 共結晶、および RES に対して通常領域のラマン測定を行った (図 6)。ART-2MRE の通常領域のラマン測定では、ART の C=O に由来する 1735 cm^{-1} のピークが低波数側にシフトしており、共結晶中の ART の C=O に分子間相互作用が形成されていることが示唆された。またこれは、既知の共結晶である ART-RES で観測されたピーク変化と同様であり、ART-2MRE でも同様の分子間相互作用の形成を示唆している。

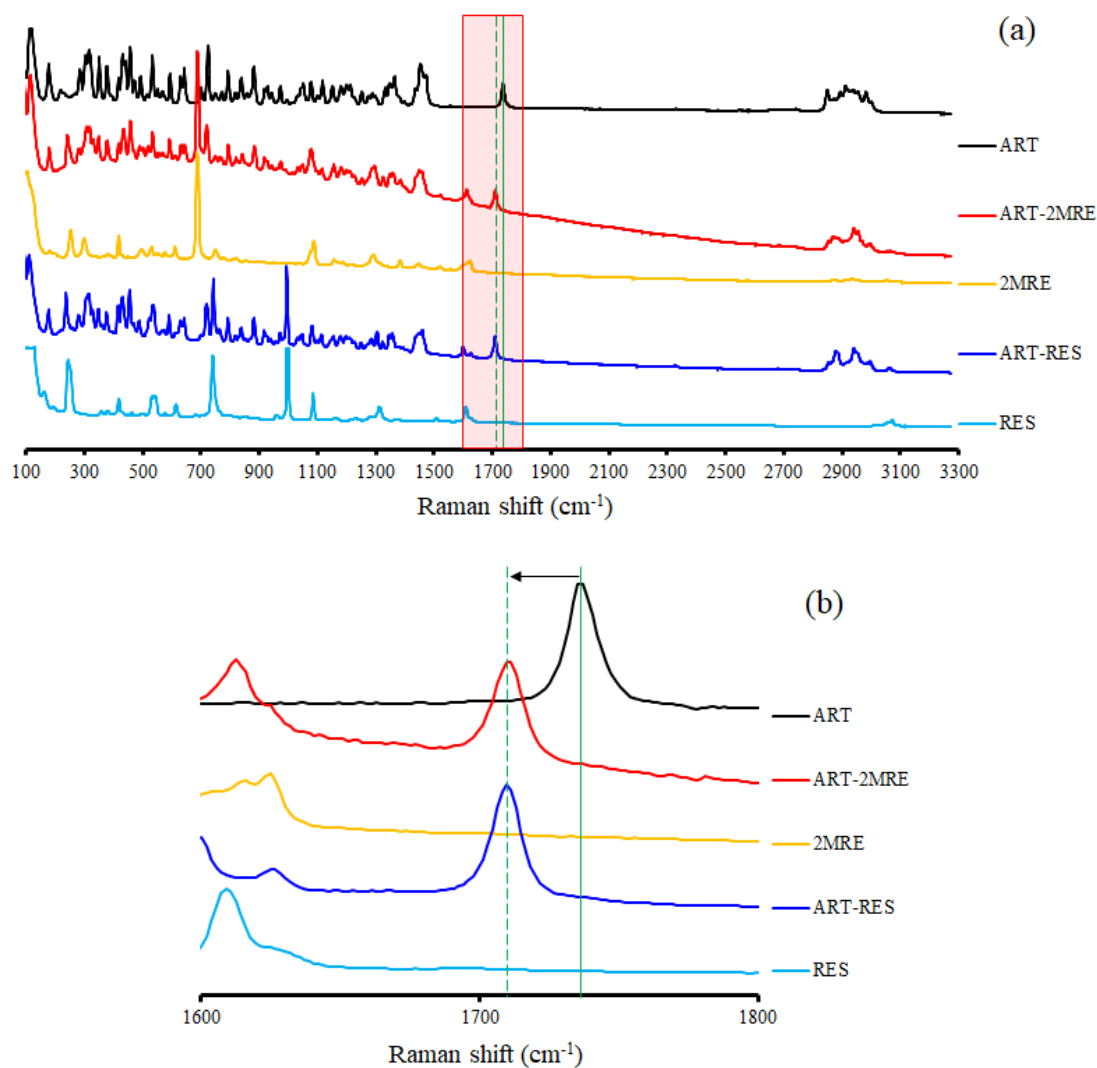


図 6 ART、ART-2MRE、2MRE、ART-RES、RES の通常領域のラマンスペクトル (a)100-3300 cm^{-1} の範囲、(b)1500-1800 cm^{-1} の拡大図 (緑実線は ART のピークトップ、緑点線は共結晶のピークトップ)

第 2 節 ART-2MRE 共結晶の単結晶 X 線構造解析 (SCXRD)

ART-2MRE 共結晶の詳細な結晶構造を考察するために、SCXRD 測定を実施した。図 7 に ART-2MRE 共結晶バルクで観測された PXRD パターンと SCXRD から計算された PXRD パターンの比較を示す。回折パターンの一致が確認され、バルクサンプルと単結晶は同一の結晶形であることが示された。また、構造解析から得られた結晶精密化パラメータを表 2 に示す。

図 8 に SCXRD によって導き出された ART-2MRE の分子間相互作用の様子及び結晶構造を、ART-RES と並べて示す。得られた構造から、ART-2MRE 共結晶は ART と 2MRE が化学量論比 2:1 で構成された共結晶であることが明らかとなった。この共結晶は ART と 2MRE 分子間では $\text{—OH}\cdots\text{O=}$ による強い水素結合や $\text{—CH}\cdots\text{O—}$ による弱い分子間相互作用を形成していた。また、これらの水素結合は左右非対称であり、既報の ART-RES 共結晶と同種の水素結合を介し、結合していた。さらに、ART-2MRE 共結晶と ART-RES 共結晶は、1 層の CCF と 2 層の ART が互い違いに並んでいるような構造をしており、それぞれの結晶構造に類似性があることが明らかになった。

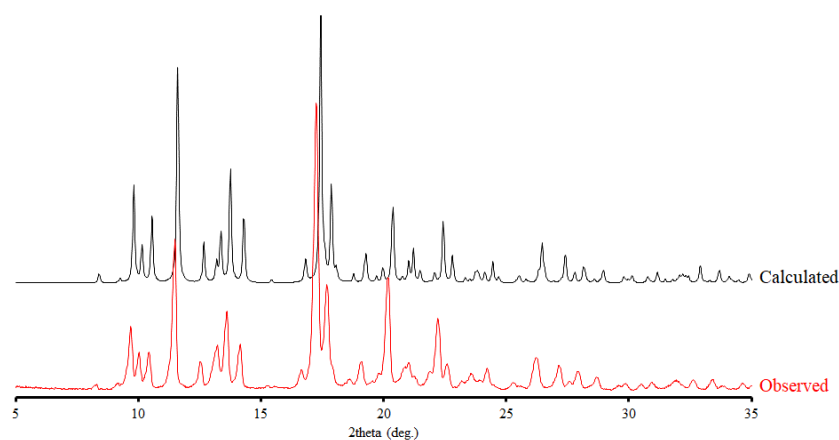


図 7 ART-2MRE バルクの PXRD パターンと SCXRD から計算した PXRD パターンの比較

表 2 SCXRD から得られた ART-2MRE 共結晶の結晶精密化パラメータ

Parameter	Value
Formula	$(\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5)_2 \cdot \text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$
Formula weight	688.808
Crystal system	monoclinic
Space group	P21
a (Å)	9.6352(4)
b (Å)	17.4088(8)
c (Å)	10.6140(4)
β (°)	98.071(7)
Volume (Å ³)	1762.73
Z	2
D_{cal} (g cm ⁻³)	1.298
μ (cm ⁻¹)	7.974
$F(000)$	740.00
$2\theta_{\text{max}}$ (°)	136.3
Reflections collected	20495
Independent reflections、 R_{int}	6219、 0.0413
R_1 ($I > 2.00\sigma(I)$)	0.0329
R (all reflections)	0.0340
w R_2 (all reflections)	0.0861
Flack parameter	0.08(5)
$\Delta\rho_{\text{max}}$ 、 $\Delta\rho_{\text{min}}$ (eÅ ⁻³)	0.19、 -0.20

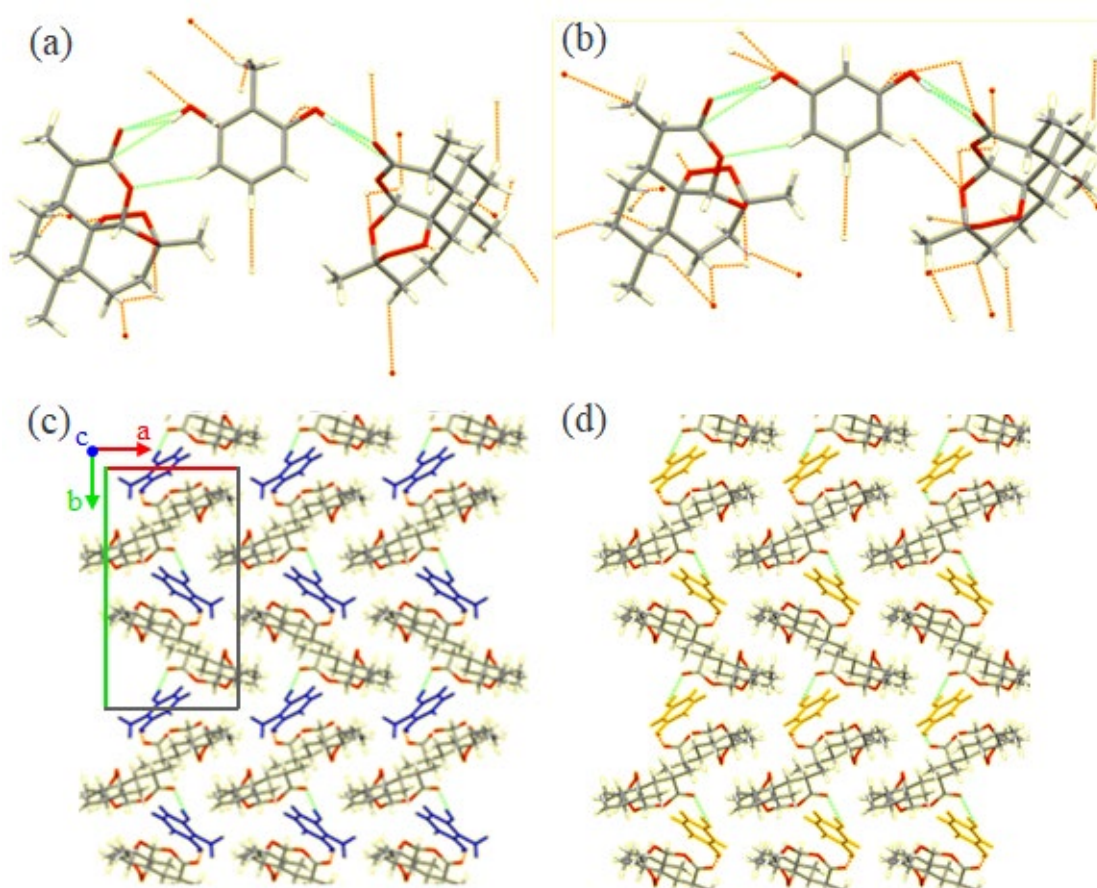


図 8 (a) ART-2MRE 共結晶の分子間相互作用の様子
 (b) ART-RES 共結晶の分子間相互作用の様子
 (c) ART-2MRE 共結晶の結晶構造
 (d) ART-RES 共結晶の結晶構造

第3節 ART 共結晶の溶出挙動モニタリング

第1項 ART 共結晶の溶出試験

共結晶化による溶解性への影響を評価するために、ART 安定形を比較対照として ART-2MRE と ART-RES の共結晶の溶出試験を日本薬局方溶出試験第2液（JP2nd、pH 6.8）にて実施した。ART の 37°Cにおける二回蒸留水への平衡溶解度は 90.1 $\mu\text{g/mL}$ である。溶出試験では、溶出試験液 300 mL に ART として 200 mg の粉末を添加したため、投入した ART 濃度は 667 $\mu\text{g/mL}$ 相当となる。溶液中の薬物濃度がその溶解度より極めて低い条件は、sink 条件と呼ばれる。本試験において投入された ART 量は、ART の溶解度を考えると全量溶解しえない、つまり non-sink 条件下での溶出試験となり、大部分が非溶解の固体で存在する。non-sink 条件下の溶出試験では、図9の模式図に示したように共結晶からの溶解と、試験液における ART の溶解度が不足しているために起こる析出の、2つの過程が両方起こる。HPLC での定量のためのサンプリングはカニューラを用いて採取し、溶解した ART 成分を濃度として定量した。

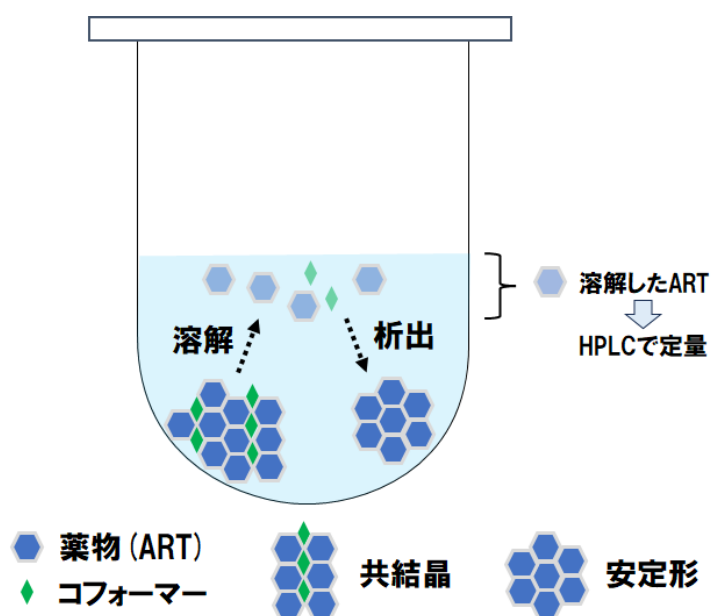


図9 Non-sink 条件下での溶出試験の模式図

ART 安定形および 2 種類の共結晶（ART-2MRE および ART-RES）の溶出試験結果を図 10 に示す。ART-2MRE 共結晶は、ART 安定形及び ART-RES 共結晶と比較して速い ART 濃度上昇を示した。しかし、試験開始 12 時間後の ART 安定形の溶解 ART 濃度（51.67 $\mu\text{g/mL}$ ）は試験開始 2 時間後の ART-2MRE 共結晶の濃度（54.43 $\mu\text{g/mL}$ ）と同程度であった。このことから、ART-2MRE 共結晶の大部分は試験開始 20 分後には安定形に転移したのではないかと推察された。ART-RES 共結晶は、7.5 分時点までの初期溶解では ART 安定形よりもわずかに速い濃度上昇を示した。しかし、10 分後には、ART 安定形と ART-RES 共結晶は同様の溶解プロファイルを示し、濃度上昇速度の差は 1 分時点で最も大きくなった（図 11）ことから、ART-RES 共結晶の安定形への移行は溶解過程の非常に早いタイミング、1 分程度で起こることが示唆された。

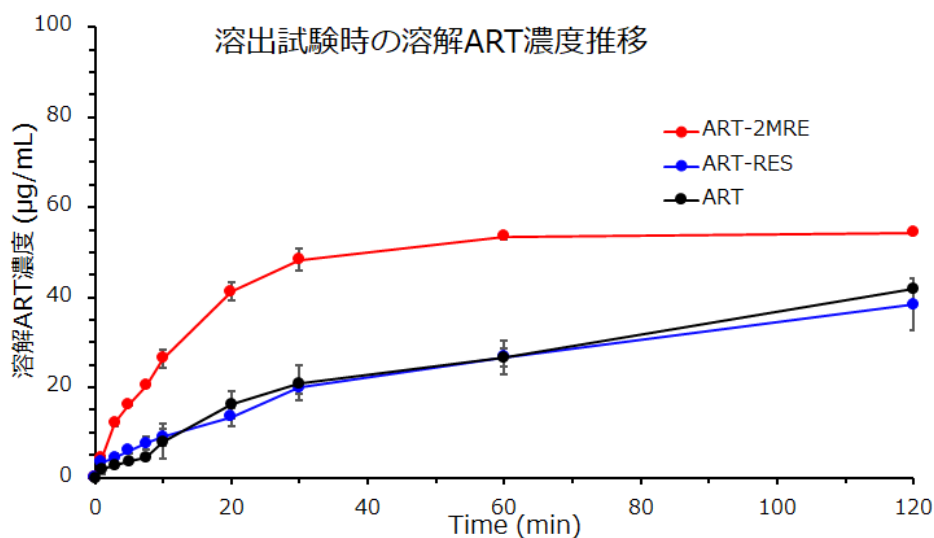


図 10 ART 及び ART 共結晶粉末の溶解 ART 濃度推移
(試験液：溶出試験第 2 液、n=3)

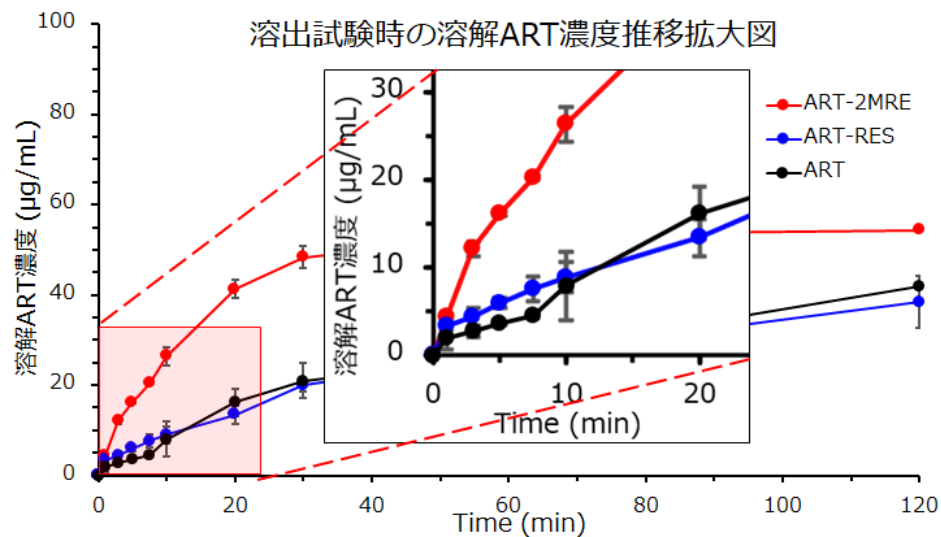


図 11 ART 及び ART 共結晶粉末の溶解 ART 濃度推移拡大図

(試験液：溶出試験第 2 液、n=3)

共結晶の溶解性はコフォーマーの溶解度と相関する傾向があると報告されている¹⁵⁾。簡易的な水への溶解度測定実験の結果、RES の溶解度は約 1.4 g/mL、2MRE の溶解度は約 0.3 g/mL であった。RES の溶解度は 2MRE の溶解度の 4~5 倍高いことから、ART-RES 共結晶の溶解速度も ART-2MRE 共結晶の溶解速度よりも速いことが予想された。しかし、溶出試験時の溶解 ART 濃度測定の結果はこれとは逆で、ART-2MRE 共結晶の方が ART の濃度上昇速度が速かった。図 8 の関係性を考えると、溶解 ART 濃度推移には、溶解と析出の両方の過程が影響する。共結晶の溶解の速さが単純に溶解 ART 濃度の上昇につながってはいないことから、析出 (ART 安定形への転移) の過程が溶解 ART 濃度に大きく影響していると推察された。この共結晶から安定形への転移を評価するには、結晶形のモニタリングが有用と考えられた。

第 2 項 LF ラマン分光法による ART-2MRE 溶出挙動モニタリング

溶出試験での共結晶溶解時における結晶状態のモニタリングを目的に、プローブ型 LF ラマン分光装置を用いて検討した。プローブ型ラマン分光装置でのモニタリングのためには、測定プローブの先の近い距離（通常 <1 cm）に測定試料がある必要がある。しかしながら、日本薬局方の溶出試験パドル法ではガラス製の厚い溶出試験用ベッセルの下部に解析対象となる結晶が堆積し、その上をパドルが回転することから、溶出試験中にプローブの先端をサンプルに近づけることができなかった。そこで、日本薬局方の溶出試験回転バスケット法で用いられるバスケットにろ紙を敷き、その上にサンプルを乗せ、そのバスケットを測定プローブの先に装着する方法により、プローブの先端に測定試料が配置される試験系を構築した（図 12）。

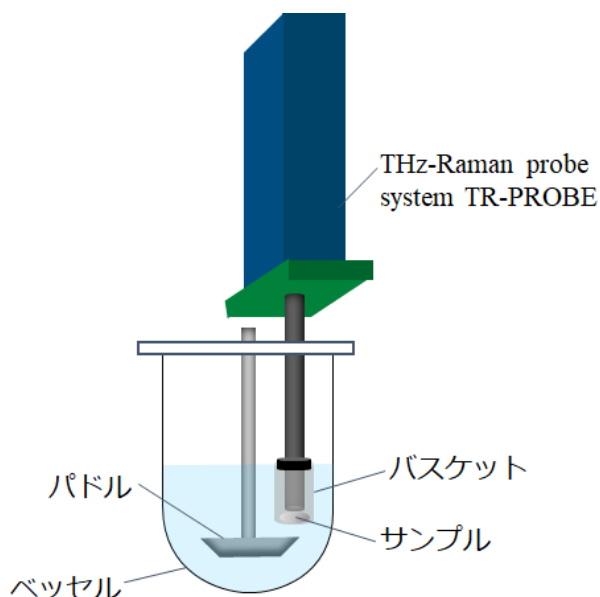


図 12 溶出試験におけるプローブ型 LF ラマン分光器を用いた
結晶状態モニタリングの模式図

ART 安定形と ART-2MRE 共結晶の LF ラマンスペクトルを測定し比較すると、2つの結晶形態を判別可能なシャープなピークは認められなかった。しかし、ART-2MRE 共結晶に特徴的なピークが 28 cm^{-1} 及び 55 cm^{-1} に、ART 安定形に特徴的なピークが 20 cm^{-1} 及び 45 cm^{-1} に認められた (図 13)。ART-2MRE 共結晶が ART に徐々に転移していく場合、 28 cm^{-1} から 20 cm^{-1} への、 55 cm^{-1} から 45 cm^{-1} へのピークシフトとして検出される。

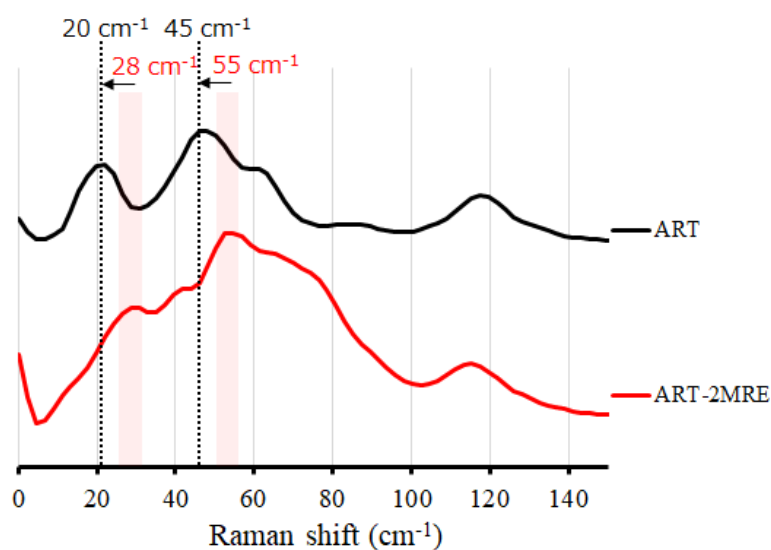


図 13 ART-2MRE と ART 安定形の LF ラマンスペクトルの比較

ART-2MRE の溶出試験時の LF ラマンスペクトルのモニタリング結果及び ART (安定形) の LF ラマンスペクトルを図 14 に示す。ART-2MRE をサンプルとして溶出試験を開始後、LF ラマンスペクトルでは ART-2MRE 共結晶に特徴的なピークから ART 安定形に特徴的なピークへ経時的なシフトが認められた。試験開始 15 分後のスペクトルには ART-2MRE に特徴的な 55 cm^{-1} のピークが認められなかったことから、試験開始 15 分後には大部分が安定形に転移していると推察された。

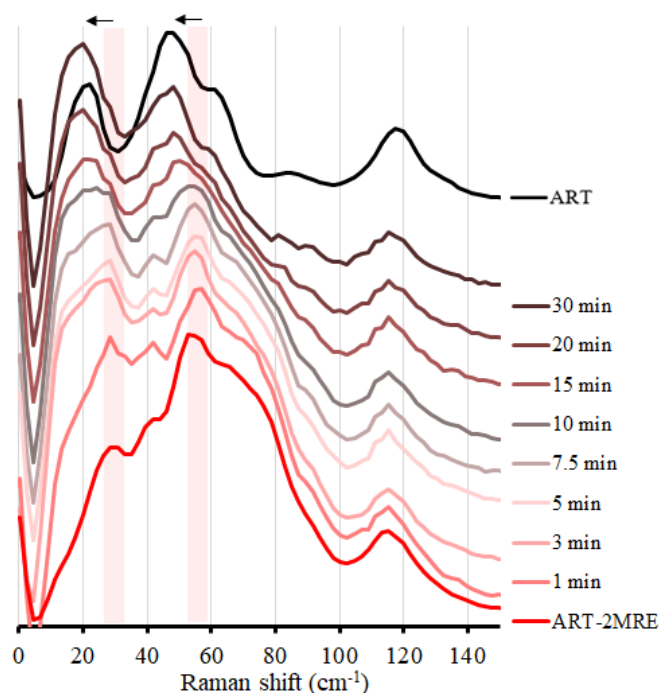


図 14 ART-2MRE 溶出試験時の LF ラマンスpekトルの経時変化
(ART-2MRE に特徴的なピークから ART 安定形に
特徴的なピークへのシフトを矢印で示した)

第 3 節第 2 項の図 12 で示した LF ラマンプローブの先端にバスケットを接続したモニタリングに加えて、第 3 節第 1 項で示した溶出試験条件と同じ条件で溶出試験を行い、測定時点における溶出試験のベッセル底部の堆積物の LF ラマンスpekトルを測定する実験も実施した。溶出試験ベッセル底部堆積物の LF ラマンスpekトル測定では、測定時点においてパドルを止め、直ちに溶出試験ベッセルの下部に堆積した非溶解固体に LF ラマンのプローブを近づけて LF ラマンスpekトル測定を行った。サンプル投入から溶出試験を開始し LF ラマンスpekトル測定するまでの一連の操作を、測定時点ごとに繰り返した。したがって、得られるデータは連続した同一サンプルのものではない。図 15 に ART-2MRE の溶出試験ベッセル底部堆積物の LF ラマンスpekトルの変化を示す。LF ラマンスpekトルは試験開始 10 分後と 20 分後の間で大きく変化しており、ART-2MRE に特徴的

な 55 cm^{-1} 付近から ART 安定形に特徴的な 45 cm^{-1} 付近へのピークシフトが認められた。試験開始後 20 分時点では ART-2MRE 共結晶に特徴的な 55 cm^{-1} 付近のピークが観測できなくなったことから、試験開始 20 分後には大部分が安定形に転移していると推察された。本結果は、LF ラマンプローブの先端にバスケットを接続したリアルタイムでのモニタリングの結果（図 14）と同様の傾向を示しており、新たに構築した LF ラマンプローブの先端にバスケットを接続したリアルタイムモニタリング方法の結果の妥当性を裏付けるものと考えた。

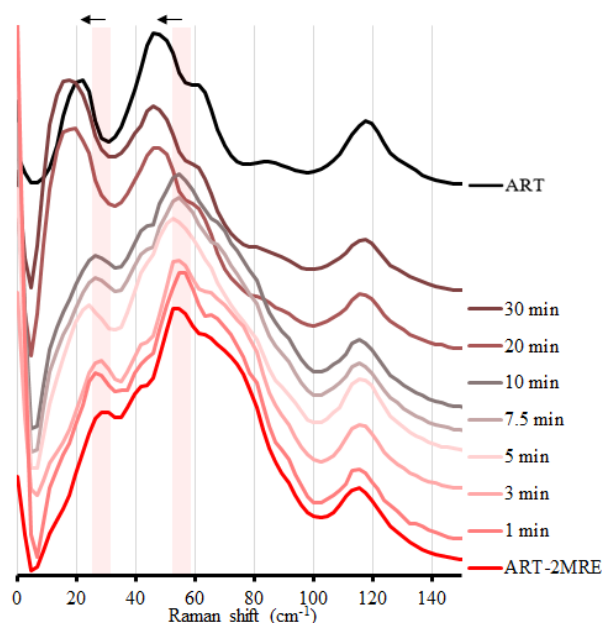


図 15 ART-2MRE 溶出試験時のベッセル底部堆積物の LF ラマンスペクトル（ART-2MRE に特徴的なピークから ART 安定形に特徴的なピークへのシフトを矢印で示した）

第 3 項 PXRD 測定による ART-2MRE 溶出挙動の評価

溶出試験での共結晶溶解時における結晶状態の評価を目的に、PXRD での測定を実施した。第 3 節第 1 項と同じ条件での溶出試験における PXRD 測定では、測定時点においてパドルを止め、直ちに溶出試験ベッセルの底部に堆積した非溶解固体をスパーテルで採取し PXRD 測定を行った。サンプル投入から溶出試験を開始し PXRD 測定するまでの一連の操作を、測定時点ごとに繰り返した。したがって、得られるデータは連続した同一サンプルのものではない。しかしながら、前項の図 13 で述べたように、ART の LF ラマンスペクトルは各結晶形に特異的なシャープなピークとしては認められなかったため、PXRD 測定では異なる結晶状態の共存時でも感度良く ART の結晶形態を検出できる可能性があると考えた。

ART-2MRE の溶出試験時の PXRD 測定結果及び ART（安定形）の PXRD パターンを図 16 に示す。得られた結果は、溶出試験の開始から ART-2MRE に特徴的なピークの経時的な減衰と、ART 安定形に特徴的なピークの経時的な増加が認められ、LF ラマンスペクトル測定（図 14）と同様の傾向を示した。ART 安定形に特徴的な $2\theta=7.5^\circ$ のピークが試験開始 3 分後から観測されるとともに、ART-2MRE 共結晶に特徴的な $2\theta=9\sim 12^\circ$ 付近のピークが徐々に減衰し、試験開始 7.5 分後から観測できなくなかった。第 3 節第 2 項の図 14 に示した LF ラマンスペクトル測定のモニタリングの結果からは、試験開始 15 分後には大部分が安定形に転移していると推察されたのに対して、本 PXRD 測定の結果では試験開始 7.5 分後に大部分が安定形に転移していることが示唆された。この時間差が生じた理由としては、PXRD 測定では測定時点においてパドルを止め、ベッセル下部に堆積した非溶解固体を採取し、PXRD 測定に供するまでの操作にかかる時間が影響を与えている可能性があると考えた。

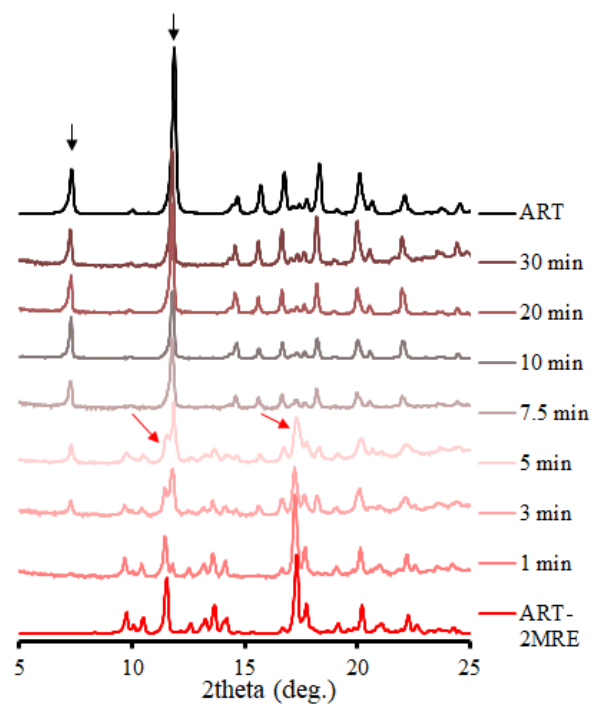


図 16 ART-2MRE 溶出試験時のベッセル底部堆積物の PXRD 測定結果
 (ART-2MRE に特徴的なピークに赤矢印、ART 安定形に
 特徴的なピークに黒矢印を示した)

第 4 項 LF ラマン分光法による ART-RES 溶出挙動モニタリング

ART 安定形と ART-RES の LF ラマンスペクトルを測定し比較すると、2 つの結晶形態を判別可能なシャープなピークは認められなかった (図 17)。しかし、ART-RES 共結晶に特徴的なピークが 32 cm^{-1} 及び 56 cm^{-1} に認められるのに対し、ART 安定形に特徴的なピークが 32 cm^{-1} ではなく、 45 cm^{-1} に認められた。ART-2MRE が ART 安定形に徐々に転移していく場合、 32 cm^{-1} のピークが次第に消失するとともに、 56 cm^{-1} のピークから 45 cm^{-1} のピークシフトが検出される。

ART-RES 共結晶の溶出試験の結果 (図 11) から、ART-RES 共結晶については、溶解過程で安定形への転移が非常に早く起こっていることが推察された。PXRD では溶出試験開始後 1 分後にサンプリングをして測定するが、サンプリングから測定までの時間も考慮すると、1 分後の測定では ART-RES の溶出挙動をモニターすることはできないと考えられた。したがって、ART-RES に対しては溶出試験時の LF ラマン分光法によるリアルタイムモニタリングのみを実施した。ART-RES の溶出試験時の LF ラマンスペクトルのモニタリング結果及び ART (安定形) の LF ラマンスペクトルを図 18 に示す。試験開始直後から急速に安定形に特徴的なピークへのシフトが認められ、試験開始 30 秒後には大部分が安定形に転移していると推察された。この結果は、ART-RES 共結晶の溶出プロファイルが非常に迅速に ART 安定形の溶解 ART 濃度推移に近づくという溶出試験の結果 (図 11) と整合しており、構築した LF ラマンモニタリング法が 1 分以内に起こる非常に速い溶出挙動も評価できる可能性が示唆された。

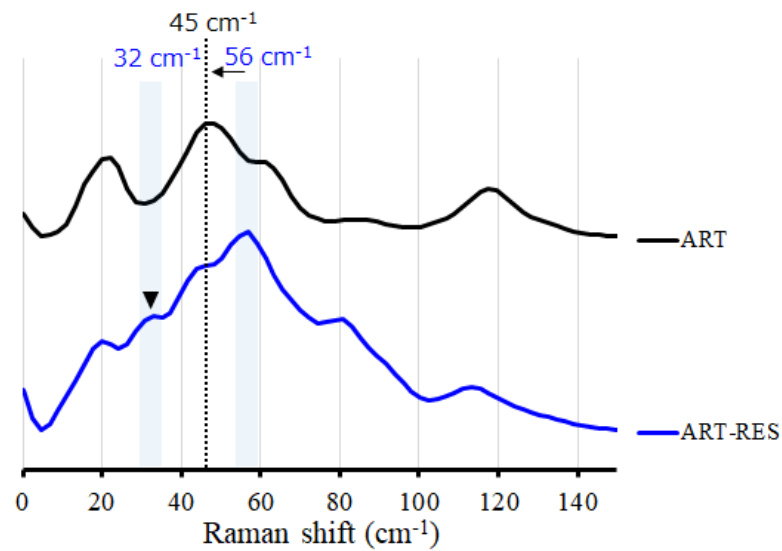


図 17 ART-RES と ART 安定形の LF ラマンスpekトルの比較

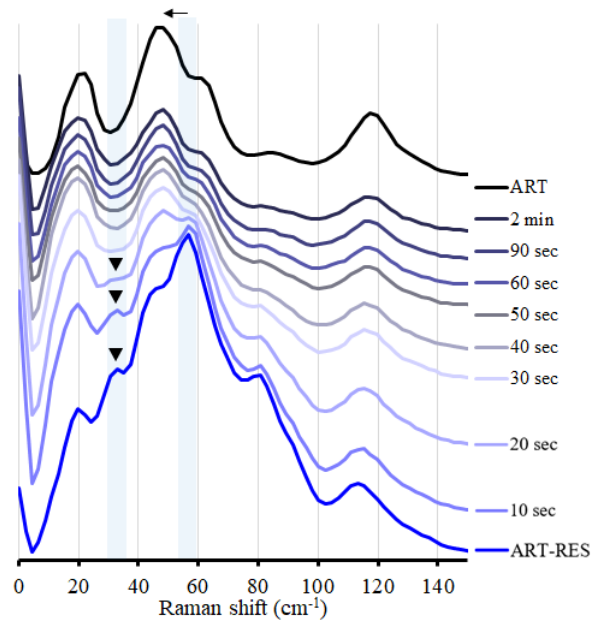


図 18 ART-RES 溶出試験時の LF ラマンスpekトルの経時変化（ART-RES に特徴的なピークから ART 安定形に特徴的なピークへのシフトを矢印で、消失する ART-RES に特徴的なピークを▼で示した）

第 4 節 HPMC を含む試験液での ART 共結晶の溶出挙動モニタリング

共結晶から安定形への転移と、溶出性との関係をさらに評価するために、再結晶化を抑制するポリマーであるヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) を 1w/v% となるようあらかじめ溶出試験液に加えて第 3 節と同様の実験を行った。HPMC は図 19 に示した構造をとり、その重合した高分子構造により安定形への再結晶化を抑制する性質を有することから、過飽和を伴う溶出挙動の評価に使用される³⁵⁾。特に ART-RES 共結晶は、通常の溶出試験第 2 液中では非常に速い安定形への転移が示唆されたが、より詳細に溶出メカニズムを考察するためにも、析出抑制のために溶出試験液への HPMC の添加は有用と考えた。ART は準安定形を有するため、HPMC により安定形への再結晶化を抑制した場合、ART 準安定形が生成する可能性がある。したがって、以降の実験では、ART (安定形) に加えて ART 準安定形も比較対照として追加した。

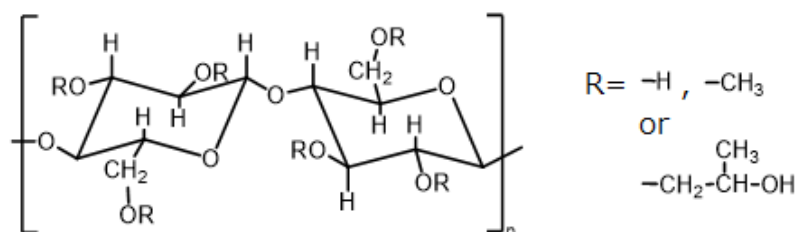


図 19 HPMC の構造式

第 1 項 HPMC を含む試験液での ART 共結晶の溶出試験

試験液に HPMC を含む溶出試験第 2 液を用いて、第 3 節の第 1 項と同様の実験を実施した。ART 安定形、ART 準安定形および 2 種類の共結晶 (ART-2MRE および ART-RES) の溶出試験結果を図 20 に示す。その結果、ART 安定形は最も遅い濃度上昇を示し、ART 準安定形と ART-RES はそれよりもわずかに速い同程度の濃度上昇を示したのに対し、ART-2MRE は大きく

溶解性が改善し、一時的な過飽和とその解消を示す溶解 ART 濃度推移を示した。

第3節第1項では、HPMC を含まない溶出試験第2液を試験液として用いた溶出試験を行い（図10）、ART（安定形）の12時間後のART安定形の溶解ART濃度は51.67 $\mu\text{g/mL}$ であった。一方、試験液に HPMC を含む系では、ART（安定形）の120分時点での溶解ART濃度は51.40 $\mu\text{g/mL}$ であった。試験液中の HPMC の有無に関わらず両者が近い溶解ART濃度を示したことから、HPMC はART（安定形）の平衡時の溶解性には実質的な影響を与えないと推察した。それにも関わらず、試験液に HPMC を含む溶出試験では、ART-RES においてはARTよりわずかに速いだけの準安定形と同程度の濃度上昇を示し、ART-2MRE においては一時的な過飽和とその解消を示す溶解ART濃度推移を示した。これらのART溶出メカニズムを結晶形の面からも評価するために、溶出試験時のLFラマンスペクトル測定によるモニタリング及びPXRD測定を実施した。

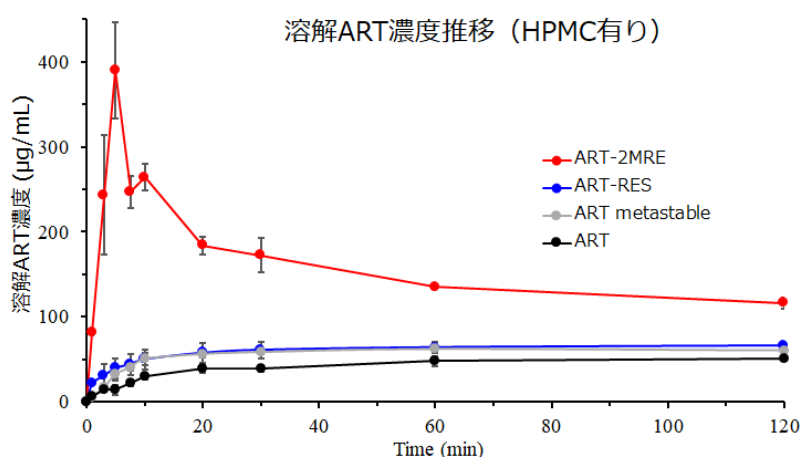


図20 ART、ART 準安定形及び ART 共結晶粉末の溶解 ART 濃度推移
(試験液：1.0 w/v% HPMC を含む溶出試験第2液、n=3)

第 2 項 LF ラマン分光法による ART-2MRE 溶出挙動モニタリング

試験液に HPMC を含む溶出試験第 2 液を用いて、第 3 節の第 2 項と同様の実験を実施した。ART-2MRE の溶出試験時の LF ラマンスペクトルのモニタリング結果、ART（安定形）及び ART 準安定形の LF ラマンスペクトルを図 21 に示す。HPMC を含む試験液での ART-2MRE の溶出過程において、ART-2MRE 共結晶に特徴的な 28 cm^{-1} 及び 55 cm^{-1} のピークは 30 分後まで残存した。このことから、30 分の試験時間を通して共結晶が残っていることが示唆された。第 4 節第 1 項の図 20 で示した ART-2MRE の溶出試験結果は、5 分時点に過飽和を示した後、それが解消されていく溶解 ART 濃度推移を示した。過飽和が解消される過程では、溶解していた ART が再結晶化により析出する過程が含まれる。しかしながら、試験開始 5 分以降も、再結晶化により析出したであろう ART 安定形に特徴的なピークは認められなかった。このことから、再結晶化により析出した ART 安定形は、直接 LF ラマンプローブでモニタリングしているバスケット内に滞在しているのではなく、バスケット外に存在しベッセル内を浮遊している可能性が考えられた。実際に、LF ラマンスペクトル測定試験終了後のベッセル内に小さな粒子が浮遊していることを目視により確認した。また、試験終了後のバスケット内には、試験開始時に投入したサンプルの大部分がバスケット内にとどまっておらず、バスケット底部に残っている固体はわずかであったことを視認した。

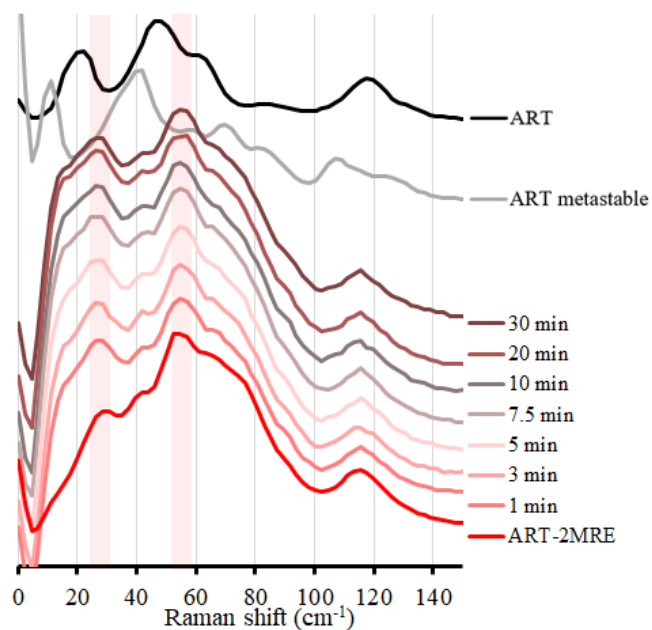


図 21 ART-2MRE 溶出試験時の LF ラマンスペクトルの経時変化

第 3 節第 2 項と同様に、溶出試験のベッセル底部の堆積物の LF ラマンスペクトルを測定する実験も実施した。図 22 にその LF ラマンスペクトル結果を示す。図 21 のリアルタイムモニタリングの結果と同様に、ART-2MRE 共結晶に特徴的な 28 cm^{-1} 及び 55 cm^{-1} のピークは 30 分後まで残存したことから、30 分の試験時間を通して共結晶が残っていることが示唆された。なお、リアルタイムモニタリングの結果と同様に、試験終了後のベッセル内には小さな粒子が浮遊していることを視認した。

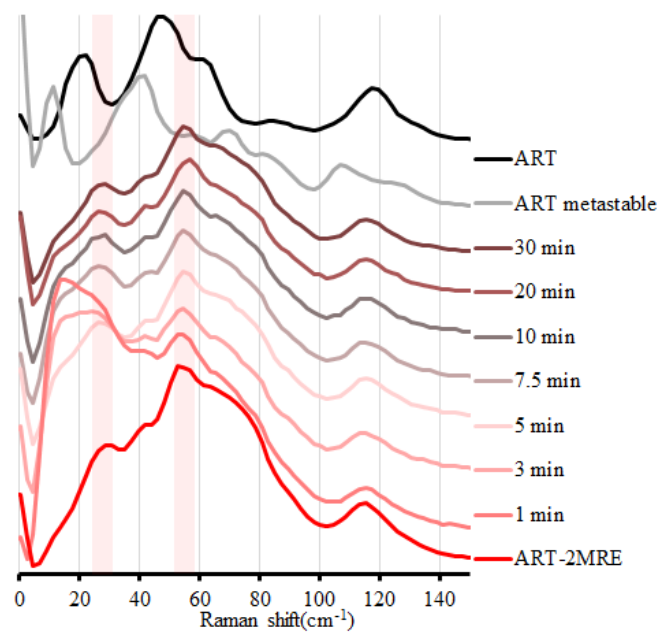


図 22 ART-2MRE 溶出試験時のベッセル底部堆積物の
LF ラマンスペクトル

第 3 項 PXRD 測定による ART-2MRE 溶出挙動の評価

試験液に HPMC を含む溶出試験第 2 液を用いて、第 3 節の第 3 項と同様の実験を実施した。ART-2MRE の溶出試験時の PXRD 測定結果、ART（安定形）及び ART 準安定形の PXRD パターンを図 23 に示す。ART 安定形に特徴的な $2\theta=7.5^\circ$ のピークが試験開始後 5 分時点から観測され、安定形が徐々に増加していくことが示唆された。これは、試験開始後 5 分時点に過飽和のピークを示し、その後過飽和が解消され、恐らく安定形として再結晶化していると推察された溶出試験の結果（図 20）と整合した。ART-2MRE 共結晶に特徴的な $2\theta=9\sim 12^\circ$ 付近のピークは試験開始後 30 分時点でも存在しており、第 3 節第 3 項で述べたように PXRD 測定が LF ラマンスペクトルのモニタリング測定よりも安定形を検知しやすい手法であることを考えると、LF ラマンスペクトルの結果（図 21）とも整合する。

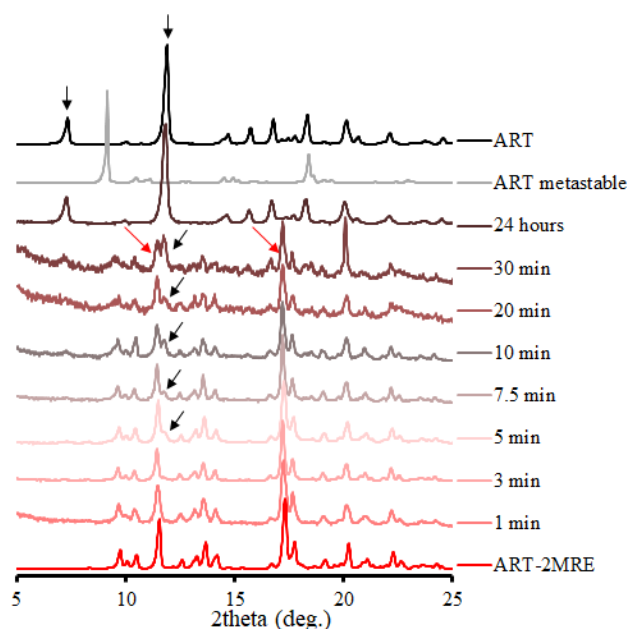


図 23 ART-2MRE 溶出試験時のベッセル底部堆積物の PXRD 測定結果
（ART-2MRE に特徴的なピークに赤矢印、ART 安定形に
特徴的なピークに黒矢印を示した）

第 4 項 LF ラマン分光法による ART-RES 溶出挙動モニタリング

試験液に HPMC を含む溶出試験第 2 液を用いて、第 3 節の第 4 項と同様の実験を実施した。ART-RES の溶出試験時の LF ラマンスペクトルのモニタリング結果、ART（安定形）及び ART 準安定形の LF ラマンスペクトルを図 24 に示す。ART-RES 共結晶に特徴的な 56 cm^{-1} 付近から ART 安定形に特徴的な 45 cm^{-1} 付近へのピークシフトが経時的に認められ、試験開始後 10 分時点では ART-RES 共結晶に特徴的な 32 cm^{-1} 付近のピークは消失した。試験開始後 7.5 分時点及び 10 分時点では ART 安定形に特徴的なピークが主に認められ、ART-RES 共結晶に特徴的なピークはわずかであることから、その時点においては大部分が共結晶としては存在しないと推察された。第 4 節第 2 項の溶出試験結果（図 20）の ART-RES の結果を精査すると、試験開始後 5 分時点までは ART（安定形）や ART 準安定形と比較して、ART-RES 共結晶ではわずかに速い濃度上昇が認められた。LF ラマン分光法によるモニタリングの結果、試験開始 5 分までは ART-RES が共結晶として存在していることが示唆されたが、この結果は溶出試験開始後 5 分までのわずかに速い濃度上昇と関連している可能性がある。

第 3 節第 2 項と同様に、溶出試験のベッセル底部の堆積物の LF ラマンスペクトルを測定する実験も実施した。図 25 にその LF ラマンスペクトル結果を示す。リアルタイムでのモニタリングの結果と同様に、試験開始後 10 分時点では ART 安定形に特徴的なピークが主に認められ、その時点においては大部分が共結晶としては存在しないと推察された。

残念ながら ART 準安定形は LF ラマンの領域において、ART 安定形及び ART-RES 共結晶と識別可能なピークを有さない。第 4 節第 2 項の図 20 に示した溶出試験結果において、ART-RES と ART 準安定形が類似した溶解 ART 濃度推移を示したことから、ART-RES は溶出試験時に ART 準安定形

にも転移している可能性が示唆されたが、いずれの LF ラマンスペクトル測定（図 24 および図 25）でも、ART 準安定形に特徴的なピークを LF ラマン分光法で検出することはできなかったと考察した。

なお、いずれの LF ラマンスペクトル測定後も、ART-RES 試験終了後のベッセル内の小さな粒子の浮遊は ART-2MRE 試験終了後と比較して少なく、モニタリング測定終了後はバスケット内に非溶解の固体が残存していることを視認した。

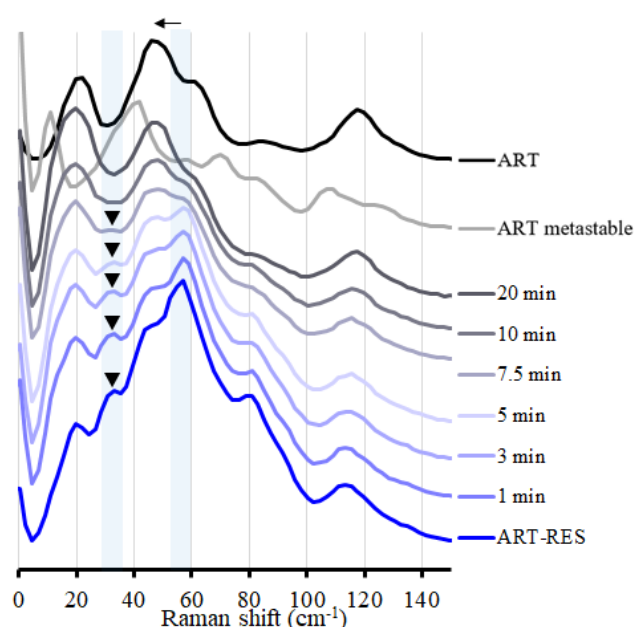


図 24 ART-RES 溶出試験時の LF ラマンスペクトルの経時変化

（ART-RES に特徴的なピークから ART 安定形に特徴的なピークへのシフトを矢印で、消失する ART-RES に特徴的なピークを▼で示した）

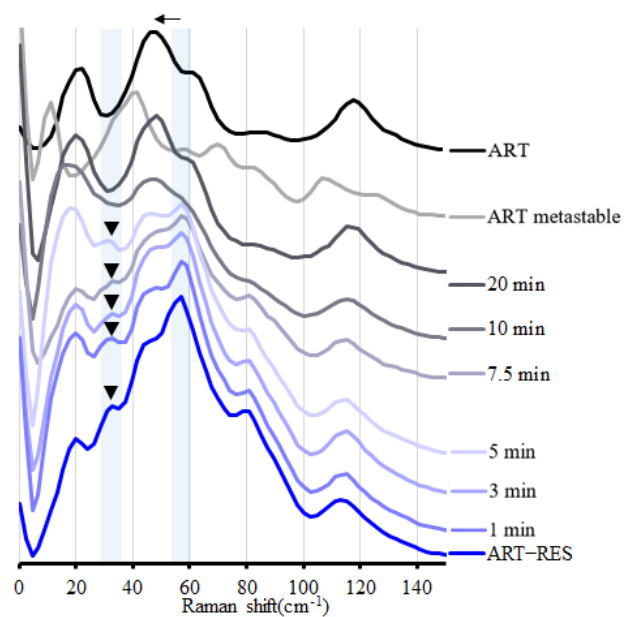


図 25 ART-RES 溶出試験時のベッセル底部堆積物の

LF ラマンスペクトル（ART-RES に特徴的なピークから ART 安定形に特徴的なピークへのシフトを矢印で、消失する ART-RES に特徴的なピークを▼で示した）

第 5 項 PXRD 測定による ART-RES 溶出挙動の評価

サンプルとして ART-RES を用いて、第 4 節の第 3 項と同様の実験を実施した。ART-RES の溶出試験時の PXRD 測定結果、ART (安定形) 及び ART 準安定形の PXRD パターンを図 26 に示す。ART 安定形に特徴的な $2\theta=7.5^\circ$ のピーク及び ART 準安定形に特徴的な $2\theta=9^\circ$ のピークの両方が、試験開始後 3 分時点から認められた。それらピークの共存が試験開始後 24 時間後でも認められたことから、ART 安定形及び ART 準安定形が長時間にわたって共存することが示唆された。ART 安定形と ART 準安定形が共存する場合、溶媒媒介転移により溶解するのは ART 準安定形の方となる。したがって、ART 準安定形が ART 安定形と共に存在すること示唆した本結果は、第 4 章第 1 項の図 20 で ART-RES の溶解 ART 濃度推移が、ART 準安定形の溶解 ART 濃度推移と試験開始 5 分後以降の時点で一致した結果と整合した。

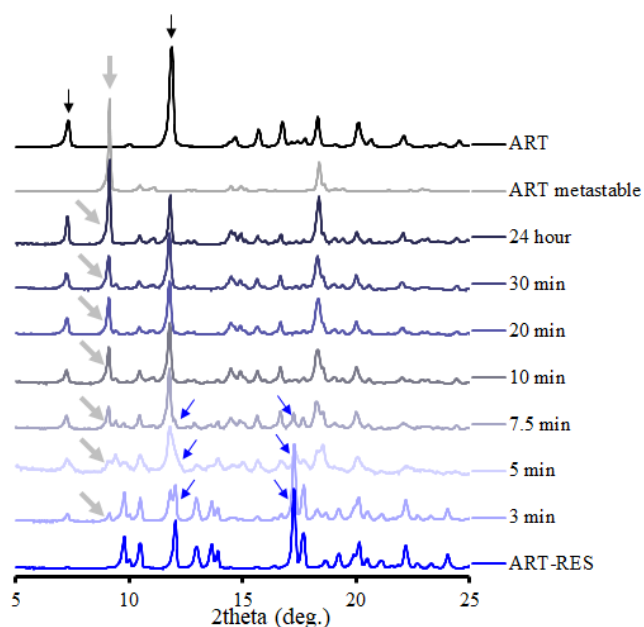


図 26 ART-RES 溶出試験時のベッセル底部堆積物の PXRD 測定結果 (ART-RES に特徴的なピークに青矢印、ART 準安定形に特徴的なピークに灰色矢印、ART 安定形に特徴的なピークに黒矢印を示した)

本試験において、ART 準安定形の生成が示唆された。準安定形の核形成は、準安定形が析出する過飽和領域に入るほど溶解 ART 濃度が高くなければおこらない。試験液に HPMC を含む ART-RES 共結晶の溶出においては、急激な過飽和状態を経て準安定形の核形成領域まで到達すると推察される。第 3 節及び第 4 節で得られたデータをもとに次節にて考察する。

第 5 節 ART 共結晶からの溶解挙動の考察

LF ラマン分光法を用いたモニタリング及び PXRD 結果から、ART-RES 共結晶は速やかに溶解し、溶解した ART から安定形への転移が非常に速いことが示唆された。ART-RES の溶出試験時の溶解 ART 濃度推移が ART 安定形と類似していたのは、溶解した ART 量としては ART 安定形と同程度のわずかし HPLC で定量されていないことを示している。つまり、共結晶の溶解により溶解した ART はそれ以上の速さで安定形へ転移していると考察した。RES の 25°C における水への溶解度が約 1.4 g/mL、ART の 37°C における水への溶解度が 90.1 µg/mL であるので、37°C で比較すると少なくとも 15000 倍の溶解度差がある。薬物とコフォーマーの溶解度差が極端に大きい場合、その安定形への転移は、表面媒介転移³⁶⁾を介して起こることが知られている。表面媒介転移は、液体が接触した粒子の表面から急速な結晶化が進む析出（安定形への転移）の機構である。ART-RES の場合、図 27（上図）に示した通り、共結晶の溶解が早く、共結晶粒子の表面近傍での局所的過飽和度が極めて高くなることが推測される。それに伴い、粒子表面における急速な核化及び急速な安定形の生成を引き起こし、ART の溶解速度に対して結晶化速度が速いことで ART 濃度の上昇が見られなかったと考えられた。LF ラマン分光法を用いたモニタリング試験後のバスケットにサンプルが安定形として残存していることも、表面媒介転移を介した転移の可能性を支持している。また、試験液に HPMC を含む試験液を用いた場合に、ART 準安定形が確認されたのは、共結晶溶解時の粒子の表面近傍での局所的過飽和度が高くなっており、安定形への結晶化が抑制された環境では準安定形が析出する過飽和領域に入るまで過飽和度が上昇したためと考えられた。

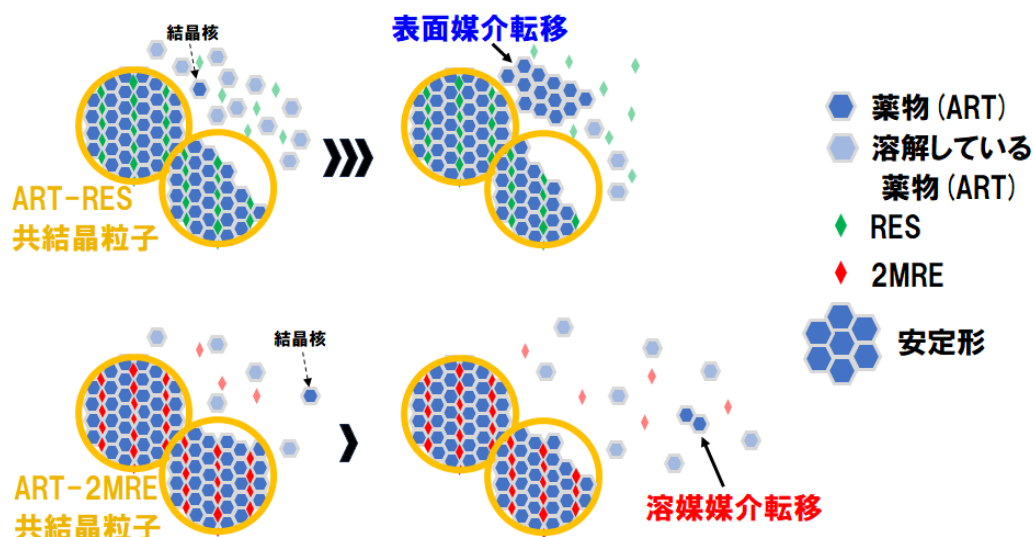


図 27 ART-RES と ART-2MRE の溶出挙動

次に、ART-2MRE 共結晶の溶出挙動について、その共結晶の溶解は ART-RES と比較して遅いと考えられた。LF ラマン分光法を用いたモニタリング及び PXRD の測定結果で共結晶に特徴的なピークは少なくとも 30 分間維持されことから、ART-MRE 共結晶の溶解は ART-RES と比較して遅いことが示唆された。析出の観点からも、LF ラマン分光法を用いたモニタリングの結果から、溶解した ART から安定形への転移が遅いことが示唆された。以上の結果から、ART-2MRE の場合、図 27（下図）に示すように溶媒媒介転移が優位であると推察された。溶媒媒介転移は準安定な共結晶が溶解し、その溶液から新たな安定形が核化して結晶が成長する転移であり、表面媒介転移ほど安定形への転移速度は速くない。LF ラマン分光法を用いたモニタリング試験後のバスケットにサンプルが残存せず、小さい粒子としてバスケットを浮遊していたことも、溶媒媒介転移を介した転移が優位に起こっている可能性を支持している。興味深いことに、試験液に HPMC を含む試験液を用いて ART-2MRE の溶出試験を実施した場合に、一時的な過飽和状態を含む最も高い溶解 ART 濃度推移を示した。このことは、単に溶解が

速く溶解度が高い共結晶よりも、共結晶を維持して過飽和状態の持続を狙う共結晶の方が溶解性の改善につながる可能性を示している。難水溶性薬物の溶出過程を LF ラマン分光法でモニタリングする本手法は、共結晶からの溶出過程を評価するツールとして有用であり、コフォーマーの選定や共結晶の製剤化時の評価にも活用されることが期待される。

第 6 節 小括

ART を用いた共結晶の検討では溶解性が向上した 2MRE との新規共結晶 ART-2MRE を見出し、その結晶構造が既報である ART-RES と類似していることを明らかにした。ART-2MRE 及び ART-RES の日本薬局方に準じた溶出試験実施時の溶出挙動を結晶形の面からも評価するために、プローブ型の LF ラマン分光法を用いて *in situ* でリアルタイムにモニタリングする方法を構築した。溶出試験時の LF ラマン分光法によるモニタリングに加えて、PXRD 測定結果及び溶解 ART 濃度推移から、薬物の溶出過程を分子レベルで詳細に考察した。その結果、ART-2MRE は共結晶の遅い溶解と溶媒媒介転移により ART の溶解性の上昇につながっているのに対し、ART-RES は共結晶の速い溶解と表面媒介転移による急速な結晶化により、ART の溶解性の向上につながらない可能性が示唆された。

第2章 CBZ 結晶多形の溶解及び結晶化過程のモニタリング

結晶化は、原薬の工業的な分離および精製プロセスの重要工程の一つである^{37),38)}。結晶化プロセスは、粒子のサイズ分布、結晶の形状、結晶多形および純度など、原薬の重要な品質特性（CQA）を決定する³⁹⁾。これらのCQAの中でも、化合物の結晶格子内の分子パッキングおよび分子間相互作用の変動に起因する結晶多形の違いは、融点、溶解度、溶解速度、化学反応性などの物理化学的性質に大きな違いを生む要因となる^{40),41)}。製薬業界では、製品名 NORVIR®として市販されているプロテアーゼ阻害剤の Ritonavir の結晶多形の転移の問題が、結晶多形の厳格な制御とモニタリングの必要性を認識させた^{40),42)}。結晶多形転移は、薬物溶解度およびバイオアベイラビリティの変化を引き起こし、治療結果に影響を与えて臨床的失敗につながる可能性がある⁴³⁾。

プロセス分析技術（PAT）は、製薬業界において、医薬品開発および生産プロセスにおける変革的なアプローチとして台頭してきた⁴⁴⁾。高度な分析ツール、リアルタイムモニタリング、およびデータ駆動型の意思決定を統合することにより、PAT は製品品質およびプロセス効率を向上させ、製薬会社にとって大きな利益をもたらす⁴⁵⁾。リアルタイムデータは、連続的なプロセスモニタリングを可能にし、事前に定義された規格内に製品品質を維持するために、プロセスパラメーターを動的に調整することができる。PAT ツールの中で、近赤外（NIR）、赤外（IR）、およびラマン分光法などの分光法は、その非破壊的で迅速かつ正確な分析能力により大きな注目を集めている⁴⁶⁾⁻⁴⁹⁾。NIR および IR 分光法はしばしば水による干渉を受け、複雑な試料準備を必要とする⁵⁰⁾のに対し、ラマン分光法は最小限の試料処理で化合物特有のスペクトルを取得することができる。これにより、ラマン分光法は *in situ* でのモニタリングに特に適している。これまでも述べたよ

うに、LF 領域のラマンスペクトルは、結晶多形に由来する格子振動の違いを散乱ピークに反映できるため、従来のスペクトル領域では識別が困難な原薬の結晶多形をモニタリングするのに有用であると期待されている⁵¹⁾⁻⁵⁴⁾。

第 2 章では、結晶多形を有するカルバマゼピン (CBZ) をモデル化合物として使用し、バルク原薬の多形転移プロセスを、LF ラマン分光法を用いてモニタリングした。既知量の各結晶多形のラマンスペクトルデータを多変量解析して、結晶形別に定量するモデルを構築し、結晶多形転移プロセスの定量的な評価を試みた。

第 1 節 メタノール中の懸濁液における CBZ 結晶多形

CBZ は多数の結晶多形の存在が認められている。本検討では、準安定形の CBZ I と安定形の CBZ III を検討に使用する結晶形とした。CBZ I と CBZ III はエナンチオトロピックな関係にあり、安定形は CBZ III である。したがって、メタノール中の CBZ I 懸濁液を温度上昇により溶解させた後、温度を下げることにより再結晶化させた場合、CBZ III が析出する。図 28 に、本試験で調製した CBZ I と CBZ III の PXRD パターン、及び CBZ I を溶解後に再結晶化した結晶の PXRD パターンを示す。CBZ I を溶解後に温度変化による再結晶化で得られた結晶の PXRD パターンは、CBZ III と一致した。

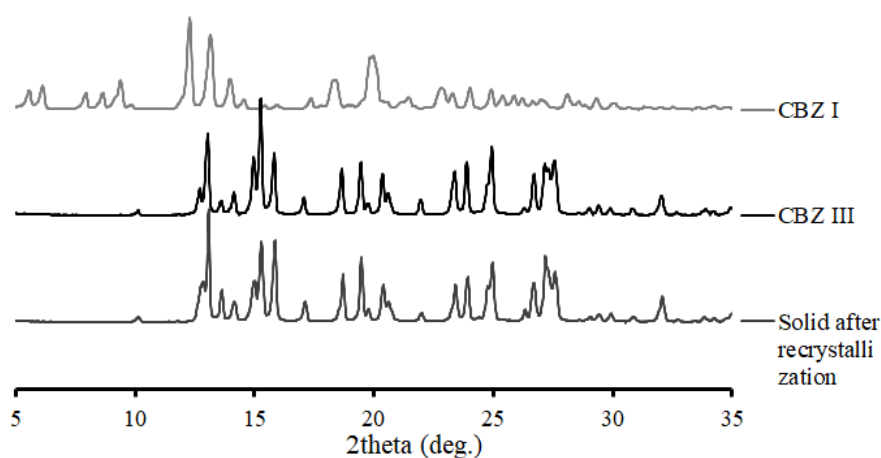


図 28 CBZ I、CBZ III 及び再結晶化後の固体の PXRD パターン

最初に、溶媒中の試料の影響を確認するために、MeOH の LF ラマンスペクトル及び CBZ を飽和させた MeOH の LF ラマンスペクトルを比較した (図 29)。その結果、2 つのラマンスペクトルに違いは認められなかったことから、メタノール中に溶解している試料の影響は非常に小さく無視できると考えた。Acevedo らは通常領域のラマンスペクトル測定により CBZ の

連続した結晶化をモニタリングし、エタノール中の溶液の溶解 CBZ 濃度の定量に成功した⁵⁵⁾。本検討では溶媒としてメタノールを用い、LF 領域のラマンスペクトル測定であることから、溶解している試料の影響が認められなかったと推察した。

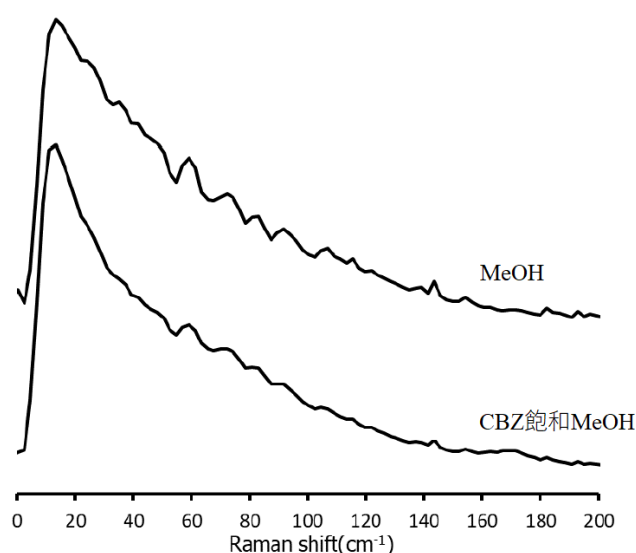


図 29 メタノール及び CBZ を飽和させたメタノールの
LF ラマンスペクトル

次に、検量データセットの LF ラマンスペクトルを確認した。メタノール中の CBZ 飽和溶液にさらに CBZ I の粉末を加えることで、メタノール中の CBZ I 懸濁液を調製した。同様に、メタノール中の CBZ 飽和溶液にさらに CBZ III の粉末を加えることで、メタノール中の CBZ III 懸濁液を調製した。図 30 に検量データセットの CBZ I 懸濁液の LF ラマンスペクトルを示す。CBZ I に特徴的な約 24 cm^{-1} 、 70 cm^{-1} 、および $109\text{--}118\text{ cm}^{-1}$ のピークが、非溶解の CBZ I 量依存的に認められた。図 31 に検量データセットの CBZ III 懸濁液の LF ラマンスペクトルを示す。CBZ III に特徴的な約 35 cm^{-1} 、および 105 cm^{-1} のピークが、非溶解 CBZ III 量依存的に認められた。

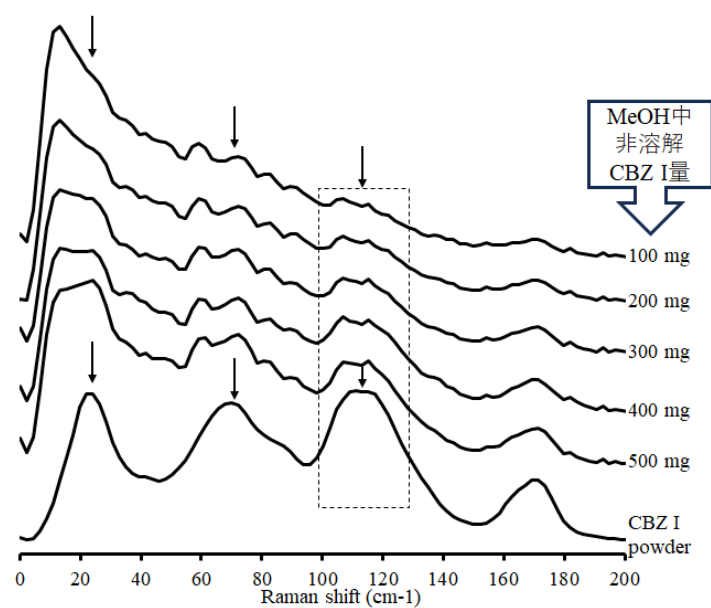


図 30 CBZ I 懸濁液の LF ラマンスペクトル
(CBZ I に特徴的なピークを矢印で示した)

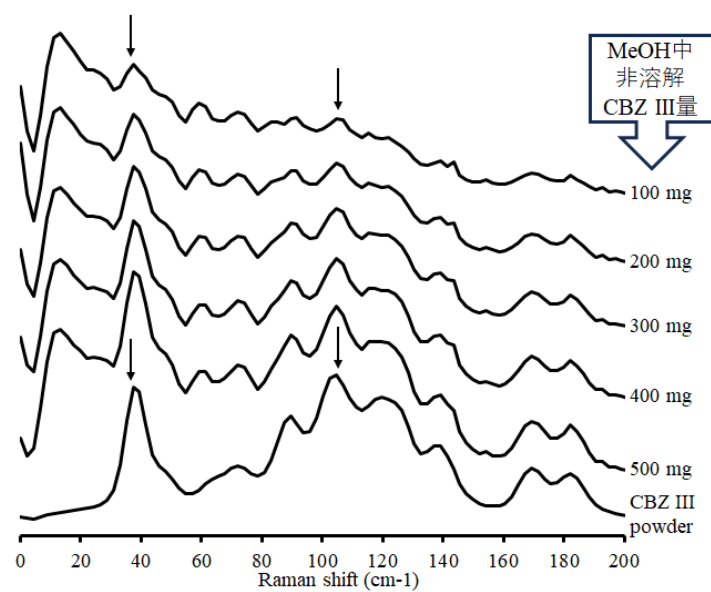


図 31 CBZ III 懸濁液の LF ラマンスペクトル
(CBZ III に特徴的なピークを矢印で示した)

第 2 節 主成分分析 (PCA)

サンプルとラマンスペクトル間の関係を理解するために有用と考え、データの次元を削減する統計的手法である主成分分析 (Principal Component Analysis: PCA) を実施した。検量データセットのサンプルに対して、Standard Normal Variate (SNV)⁵⁶⁾による前処理を施した 0-154 cm^{-1} の波数領域におけるラマンスペクトルを説明変数として PCA を行った。図 32 に PCA のスコアプロットを示す。スコアの 76.15%の変動を示す第一主成分 (PC1) は CBZ III 濃度と相関し、15.99%の変動を示す第二主成分 (PC2) は CBZ I 濃度と相関することを確認した。また、検量データセット内の外れ値または極端なサンプルの存在がないことを確認した。したがって、モニタリングプロセスにおける CBZ I もしくは CBZ III のラマンスペクトルを説明変数、それぞれの結晶多形の非溶解量を目的変数とした部分最小二乗回帰分析 (partial least squares regression: PLSR) による解析により、検量モデルが構築できる可能性が示唆された。

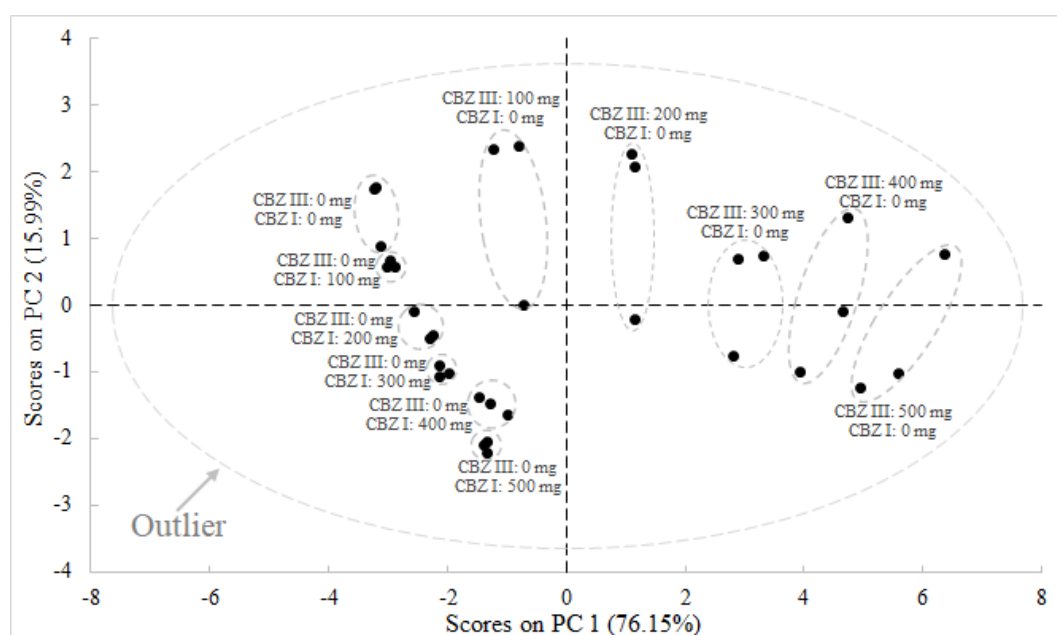


図 32 検量データセットの第一及び第二主成分の PCA スコアプロット

第 3 節 検量モデルの構築

検量データセットを使用して、メタノール中の各結晶多形の非溶解 CBZ 量について、PLSR により検量モデルの構築を試みた。まず PLS 因子数の検討を実施した。

検量モデルを構築するには、最適なモデルを得るために必要な潜在変数 (Latent variable: LV) の数を把握する必要がある。潜在変数の数は情報の取得に重要であるが、オーバーフィッティングを避けるために余分な潜在変数を含むべきではない。PLSR モデルを計算するためのアルゴリズムとして、Sijmen de Jong が開発した SIMPLES を適用した。このアルゴリズムは、3 つの潜在変数のモデルが最適であることを示した。表 3 に、CBZ III に対する 2、3、または 4 つの潜在変数の予測性能の比較結果を示す。3 つの潜在変数のモデルは十分に小さい RMSECV を示すことを確認した。また、CBZ I の入力データに対する最初の 3 つの潜在変数は、応答データの 98.23%を説明し、CBZ III の入力データに対する最初の 3 つの潜在変数は、応答データの 98.13%を説明したことからも、潜在変数を 3 とすることは妥当と判断した。

表 3 PLS 因子数の違いによる CBZ III の PLSR モデルの性能評価

Number of PLS factor	Preprocessing method	R ²	RMSEC (mg)	RMSECV (mg)
2	SNV	0.986	21.4	24.2
3		0.993	16.3	19.2
4		0.994	15.0	18.9

良好な真度を示す検量モデルを開発するために、次にラマンスペクトルの前処理方法の最適化検討を実施した。4 種の異なるスペクトル前処理を施し構築した検量モデルを表 4 に示す。LF ラマンスペクトルの前処理方法として SNV を選択した場合に、検量モデルが最も低い RMSECV を示したことから、SNV をラマンスペクトルの前処理方法として選択した。

表 4 異なる前処理方法による CBZ III の検量モデルの性能評価

Preprocessing method	Number of PLS factor	R ²	RMSEC (mg)	RMSECV (mg)
SNV	3	0.991	19.2	15.3
MSC		0.990	24.7	16.9
Savitzky-Golay 1 st derivative (window size: 25 points, polynomial order: 2)		0.991	18.8	17.9
Savitzky-Golay 2 nd derivative (window size: 25 points, polynomial order: 2)		0.990	20.2	18.0

第 4 節 検量モデルの評価

図 33 に検量データセットを用いて非溶解 CBZ I 量を説明変数とした時の PLSR スコアプロットを示す。また、その時のローディングプロットを図 34 に示す。スコア分散の 69.32%を占める因子 1 のローディングプロットは、CBZ I のスペクトルと類似していた。同様に、図 35 に非溶解 CBZ III 量を説明変数とした時の PLSR スコアプロットを示す。また、その時のローディングプロットを図 36 に示す。スコア分散の 76.11%を占める因子 1 のローディングプロットは、CBZ III のスペクトルと類似していた。これらの結果は、構築した検量モデルが各結晶多形の非溶解 CBZ 量の変化と相関することを示唆している。

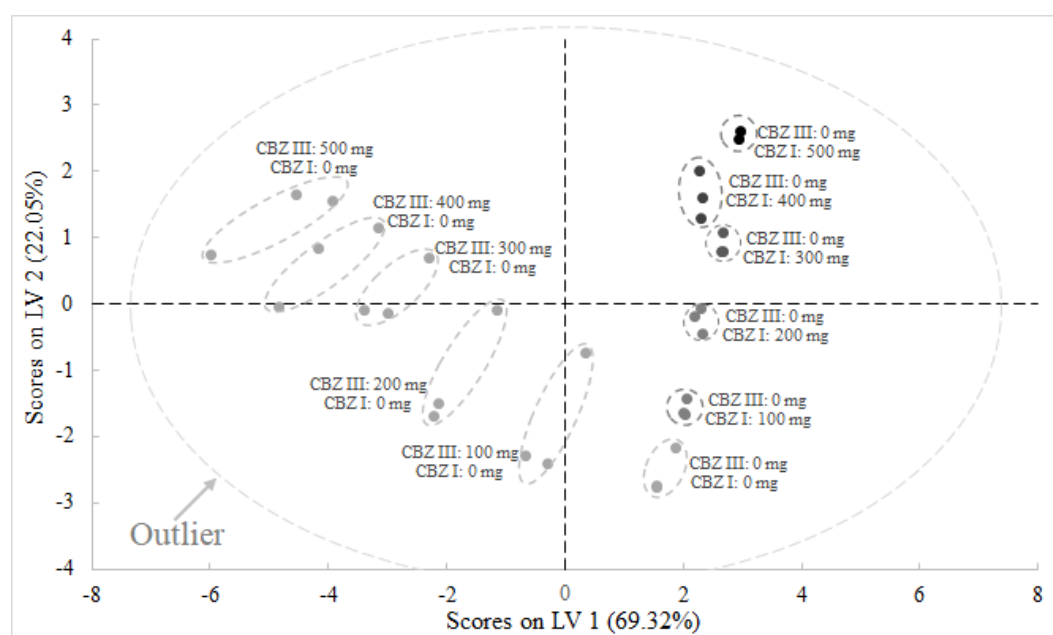


図 33 CBZ I の PLSR スコアプロット

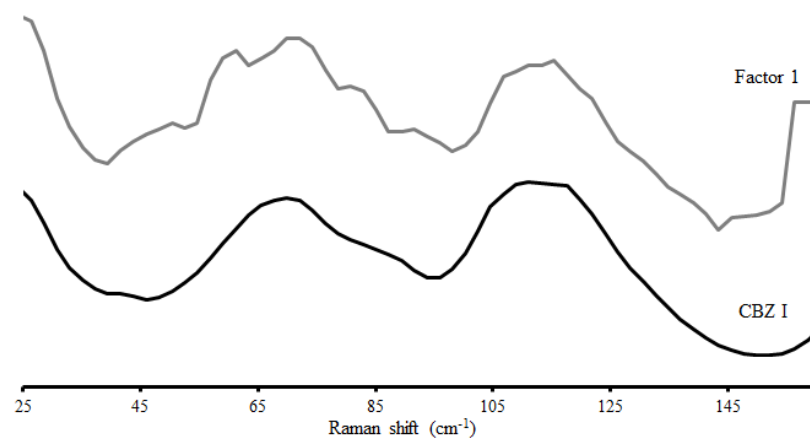


図 34 CBZ I の因子 1 のローディングプロット

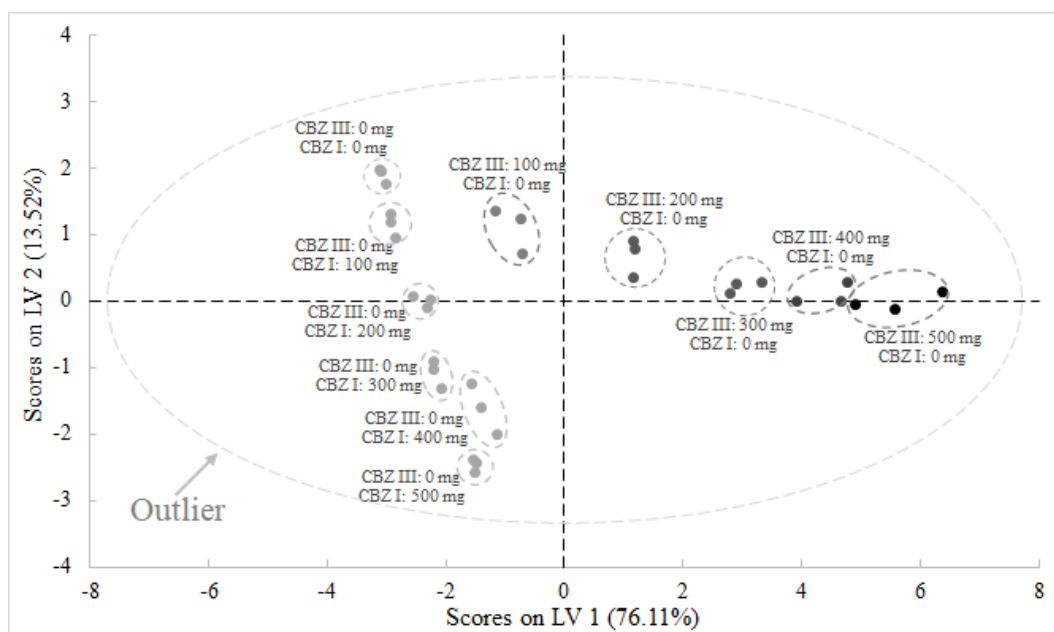


図 35 CBZ III の PLSR スコアプロット

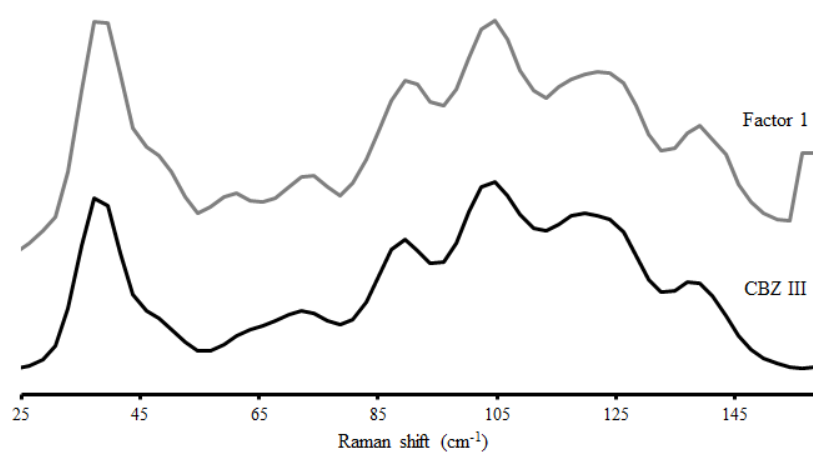


図 36 CBZ III の因子 1 のローディングプロット

各結晶多形に対して構築された検量モデルによる実際の値と予測値の非常に良好な相関関係を図 37 に示す。検量データセットから求められた R^2 、RMSEC、RMSECV、及び、検量モデルとバリデーションセットから求められた RMSEP も図 37 に示す。CBZ I の R^2 値は 0.984、CBZ III の R^2 値は 0.991 であり、既報のカルバマゼピンの結晶多形の定量モデルと比較しても同等の良好な相関を示した。これまで、通常領域のラマン分光法と多変量解析を組み合わせ、カルバマゼピンの結晶多形の定量を試みた報告がされている。Tien らは水懸濁液中における CBZ I から二水和物への転移について、確立したモデルの R^2 値が 0.998 (RMSECV は 1.70%) であり、乾燥粉末中における CBZ I から二水和物への転移のモデルの R^2 値が 0.982 (RMSECV は 4.56%)、CBZ III から二水和物への転移のモデルの R^2 値が 0.952 (RMSECV は 7.71%) であったと報告している⁵⁷⁾。また Farias らは CBZ 錠剤中の CBZ I 及び CBZ III の定量に確立したモデルの R^2 値がそれぞれ 0.965 及び 0.994 (RMSECV は 5.19% 及び 3.49%) であったことを報告している⁵⁸⁾。仮に図 37 に示した本検討で得られた RMSECV を、非溶解 CBZ として添加した最大値の 500 mg を 100% として、単位を%として表すと、CBZ I の RMSECV は 5.14%、CBZ III の RMSECV は 3.84% となる。したがって、これまでの報告とも同等な予測性能を有する検量モデルの構築が、LF ラマン分光法と多変量解析を組み合わせた方法でも可能であること示された。

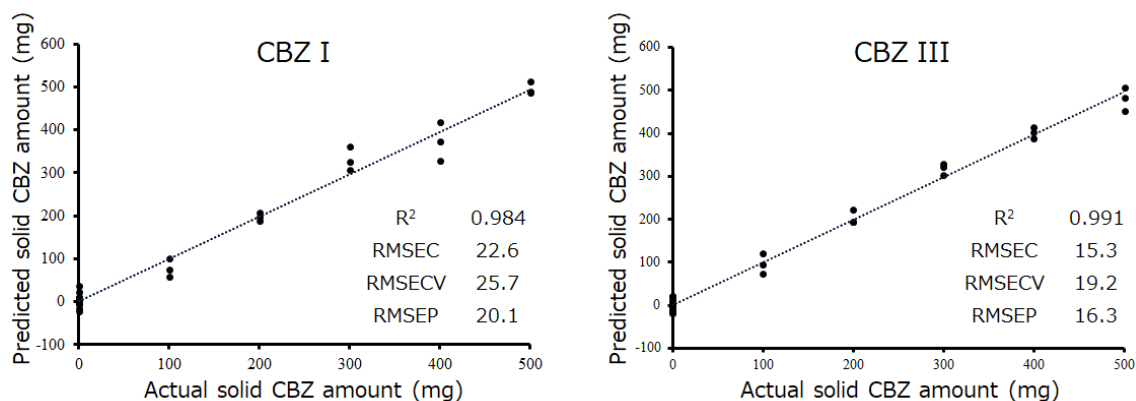


図 37 非溶解 CBZ I 及び CBZ III 量の予測プロット

構築された検量モデルとバリデーションセットにより求められた RMSEP は、CBZ I が 20.1 mg、CBZ III が 15.3 mg であった。これらの RMSEP を非溶解 CBZ として添加した最大値の 500 mg を 100% として、単位を% として表すと、CBZ I の RMSEP は 4.02%、CBZ III の RMSEP は 3.06% となり、USP<858>の真度の判断基準である回収率 $100.0\% \pm 5.0\%$ を満たす水準であった。またこれらの RMSEP を非溶解固体の濃度に換算すると、それぞれ 5.74 mg/mL と 4.37 mg/mL に相当する。したがって、この方法は 0～143 mg/mL の非溶解固体の濃度範囲で良好な RMSEP を示しており、低濃度を含むインラインの結晶多形解析に有用な、良好な予測結果を示す検量モデルの構築に成功した。

第 5 節 CBZ の溶解及び結晶化過程の定量評価

CBZ 結晶多形の溶解及び結晶化への検量モデルの適用は、3.5 mL のメタノール中 CBZ 飽和溶液に、さらに 500 mg の CBZ I を追加したサンプルを用いて検証した。サンプルの温度を 20°C から 60°C に +2°C/分の速度で上昇させ、60°C で 20 分間保持した後、60°C から 20°C に -0.5°C/分の速度で冷却した。LF ラマンスペクトルを 120 秒ごとに測定した結果の一部を図 38 に示す。温度の上昇に伴い、CBZ I に特徴的な約 24 cm⁻¹、70 cm⁻¹、および 109-118 cm⁻¹ のピークが消失していき、その後の冷却に伴い、CBZ III に特徴的な約 35 cm⁻¹ および 105 cm⁻¹ のピークが増加した。

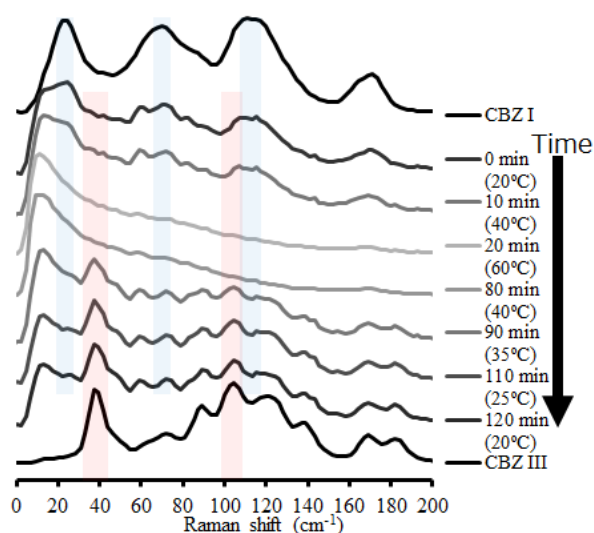


図 38 LF ラマンスペクトル測定による CBZ の溶解及び結晶化過程のモニタリング（CBZ I に特徴的なピークを青で、CBZ III に特徴的なピークをピンクで示した）

温度コントロール時の LF ラマン分光法によるモニタリング結果を、構築した検量モデルを用いて各結晶多形の時間変化を定量した結果を図 39 に示す。温度上昇に伴う CBZ I の溶解により非溶解 CBZ I 量が減少していき、60°C まで上昇した時点で大部分が溶解していることが示唆された。ま

た温度下降により、約 35℃まで冷却した時点で CBZ III が析出し始めることが示唆された。CBZ の溶解及び結晶化過程における、代表的な時点の懸濁液の画像を図 40 に示す。得られた定量結果は、懸濁液の画像ともおよそ相関していた。LF ラマン分光法が、結晶多形を有する化合物の結晶化プロセス中に、薬物の結晶状態をリアルタイムで容易かつ非破壊的にモニタリングできる有用なプロセス分析技術ツールとなりうる可能性が示唆された。

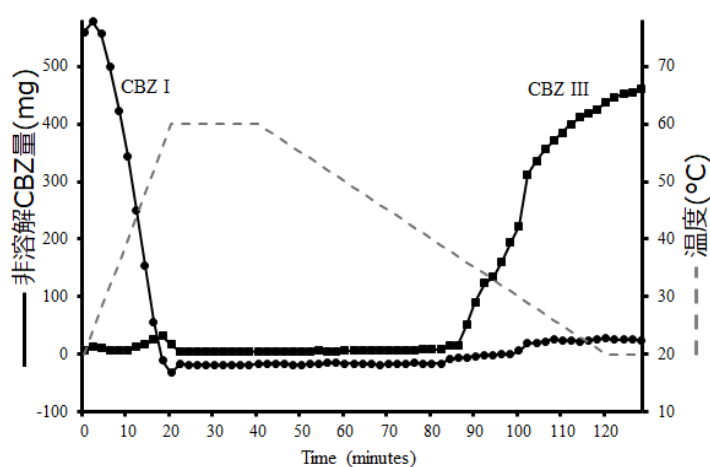


図 39 各結晶多形の非溶解 CBZ 量の定量結果時間推移 (n=2)

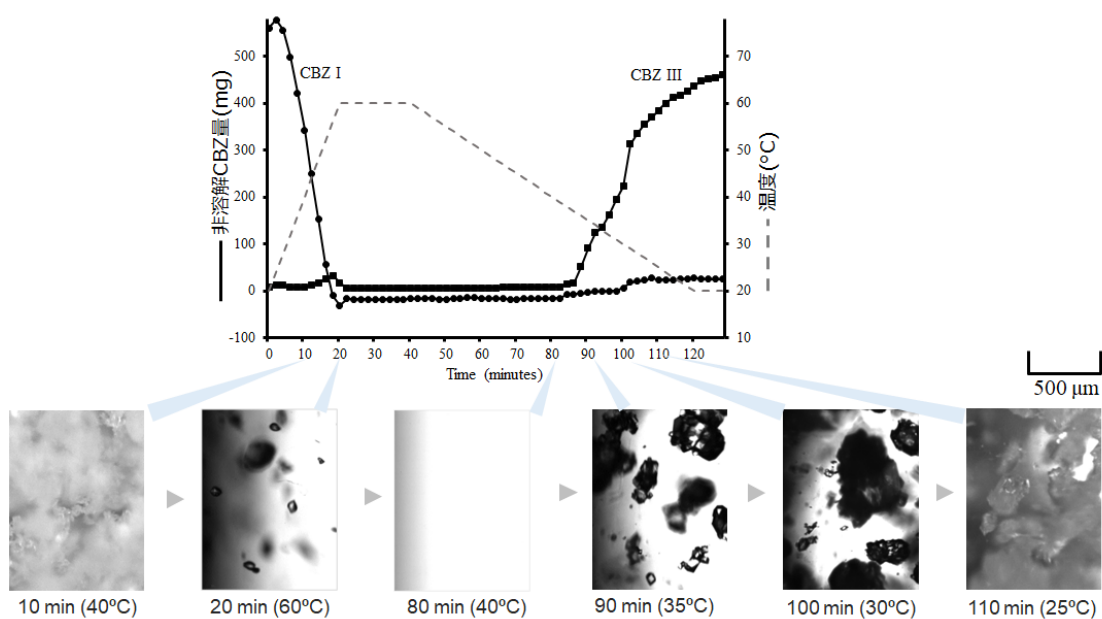


図 40 代表的な時点における懸濁液の画像

第 6 節 小括

本研究では、CBZ の準安定形である CBZ I 及び安定形である CBZ III について、LF ラマンスペクトル測定と多変量解析を組み合わせることにより、懸濁液中での原薬溶解過程及び結晶化工程において各結晶多形の非溶解 CBZ 量の定量が可能な検量モデルの構築に成功した。得られた検量モデルは良好な予測性能結果を示し、CBZ 懸濁液の温度上昇及び下降時の LF ラマン測定により、各結晶形の非溶解 CBZ 量がモニタリング可能となった。以上の結果から、LF ラマン分光法が、結晶多形を有する化合物の結晶化プロセス中に、薬物の結晶状態をリアルタイムで容易かつ非破壊的にモニタリングできる有用な PAT ツールとなりうる可能性が示唆された。

総括

第1章では、ARTを用いた共結晶の検討において溶解性の向上が認められた2MREとの新規共結晶ART-2MREを見出し、その結晶構造が既報であるART-RESと類似していることを明らかにした。ART-2MRE共結晶及びART-RES共結晶の日本薬局方に準じた溶出試験実施時の溶出挙動を結晶形の面からも評価するために、プローブ型のLFラマン分光法を用いて *in situ* でリアルタイムにモニタリングする方法を構築した。溶出試験時のLFラマン分光法によるモニタリングに加えて、PXRD測定及び溶解ART濃度推移の測定の結果から、薬物の溶出過程を分子レベルで詳細に考察した。その結果、ART-2MREは共結晶の遅い溶解と溶媒媒介転移によりARTの溶解性の向上につながっているのに対し、ART-RESは共結晶の速い溶解と表面媒介転移による急速な結晶化により、ARTの溶解性の向上につながらない可能性が示唆された。

第2章では、CBZの準安定形であるCBZ I及び安定形であるCBZ IIIについて、LFラマンスペクトル測定と多変量解析を組み合わせることにより、懸濁液中での原薬溶解過程及び結晶化工程において各結晶多形の非溶解CBZ量の定量が可能な検量モデルの構築に成功した。得られた検量モデルは良好な予測性能結果を示し、CBZ懸濁液の温度上昇及び下降時のLFラマン測定により、各結晶形の非溶解CBZ量が定量的にモニタリング可能であることを示した。以上の結果から、LFラマン分光法が、結晶多形を有する化合物の結晶化プロセス中に、薬物の結晶状態をリアルタイムで容易かつ非破壊的にモニタリングできる有用なPATツールとなりうる可能性が示唆された。

本研究では、LFラマンラマンスペクトル測定が、薬物の溶解や結晶化といったプロセスに対し、結晶形態の判別という定性的な評価だけでなく、

定量的な評価も可能なことを示した。プローブ型の LF ラマン分光器は、
そうした定性的／定量的な評価を、*in situ* でリアルタイムにモニタリング
を可能にする有用なツールである。本技術が、医薬品の開発においてさら
に幅広く活用されることを期待したい。

実験の部

第 1 章 ART 新規共結晶の溶出挙動モニタリングの実験

【1】試薬

ART は Chulalongkorn 大学、Pharmaceutical Sciences、Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany、Natural Products for Ageing and Chronic Disease Research Unit（タイ、バンコク）から入手した。ART（化学純度 >97.0%）は東京化成工業株式会社（東京）から購入した。2MRE（化学純度 >98.0%）と RES（化学純度 >99.0%）は東京化成工業株式会社（東京）から購入した。ART 準安定形は、以下の手順により ART 安定形から調製した⁵⁹⁾。300 mg の ART 安定形を 5 mL の酢酸エチルに溶解した。次に 5 mL の水を加えて水層と酢酸エチル層を分離し、酢酸エチル層をエバポレーターを用いて揮発させた。水層に沈殿した白色粉末（ART 準安定形）を、吸引ろ過により収集した。

【2】共結晶スクリーニング

溶媒添加粉碎法（LAG 法）

ART とコフォーマーを化学量論比 1:1 で合計重量が 50 mg となるように秤量し、メノウ乳鉢で予備粉碎した後に 5 mL チューブに 5 mm 径のジルコニアビーズ 2 個と共に入れた。さらに溶媒として AcOEt またはエタノールを 10 μ L 添加した。粉碎は Cell Destroyer（PS1000、Pro Sense Inc.、東京）を使用し、回転数 3000 rpm、3 分を 3 回実施した。

【3】共結晶のスケールアップ調製

スラリー法

ART を 600 mg 秤取し、2MRE または RES を ART に対して化学量論比で

1:5 となるように溶解した 260 mg/mL コフオーマー水溶液 5 mL に添加し、懸濁液とした。この懸濁液をマグネティックスターラーを用いて 24 時間 300 rpm で攪拌した。反応後、残ったコフオーマーを除くために懸濁液を吸引ろ過し、得られた結晶を室温（20-25℃程度）で 1 時間減圧乾燥した。

【4】分析装置および分析条件

共結晶の結晶性評価は下記の装置により行った。

【4-1】PXRD

PXRD 測定は以下の条件で行った。

装置	: Miniflex600（株式会社リガク、東京）
測定範囲	: 5.0-35.0° (2 θ)
測定速度	: 20.0°/min
ステップサイズ	: 0.02°/s
チューブ電圧および電流	: 40 kV/15 mA

【4-2】通常領域ラマン分光法

ラマン分光測定は以下の条件で行った。

装置	: RAMAN ALL-IN-ONE（MarqMetrix 社、米国）
励起レーザー波長	: 785 nm
レーザー出力	: 450 mW
露光時間	: 3 秒
積算回数	: 5 回

【4-3】DSC

DSC 測定は窒素パージ下、以下の条件で行った。

装置	: Thermo plus EVO2 TG-DTA8121（株式会社リガク、東京）
昇温速度	: 5°C/min

【5】単結晶 X 線構造解析 (SCXRD)

【5-1】ART-2MRE 共結晶単結晶の取得

ART-2MRE は溶媒蒸発法にて単結晶を取得した。スラリー法で調製した ART-2MRE 共結晶 100 mg を 5 mL の AcOEt に加え、マグネティックスターラーを用いて 300 rpm で 1 時間攪拌し完全に溶解した。この溶液の溶媒を室温 (20-25°C 程度) 下で徐々に蒸発させた。得られた結晶から適切な結晶を選択し、単結晶構造解析に用いた。

【5-2】単結晶 X 線構造解析 (SCXRD)

SCXRD は以下の条件で行った。

装置	: R-AXIS RAPID diffractometer with MicroMax-007 HF (株式会社リガク、東京)
X 線源	: CuK α ($\lambda=1.54187\text{\AA}$)
チューブ電圧および電流	: 40 kV/30 mA

【6】共結晶の溶出挙動

【6-1】試料の調製

スケールアップにて得た試料についてメノウ乳鉢を用いて粉砕した後、篩過を行い 150 μm ふるいを用いて粒子径を均一に揃えた。各共結晶は ART として 200 mg となるよう秤量し試験に用いた。

【6-2】溶出試験

溶出試験液は、第 17 改正日本薬局方における第二法に準拠した溶出試験第 2 液 (pH=6.8) を調製した。同様に調製した溶出試験第 2 液 (pH=6.8) に、ART の再結晶化の阻害を目的として HPMC を 1.0 w/v% になるように加えた溶液も調製した。

第 17 改正日本薬局方におけるパドル法に準拠して行った。6 連式溶出試験機 DT 126 Light (ERWEKA GmbH.) に試験液を 300 mL 加えた。パドル回転数 50 rpm、温度 37°C でサンプルを加え、1、3、5、7.5、10、20、30、60、120 分で 1 mL のサンプリングを行った。

【6-3】 定量方法

溶出試験サンプルにおける ART 濃度の測定は、210 nm にセットされた UV 検出器を備えた HPLC システム (Agilent 1100 series (Agilent technologies)) にて実施した。分析には 45°C に設定した C18 カラム (Inertsil® ODS-3 (5 μ m, 4.6×250 mm、GLSciences Inc.)) を用い、移動相はアセトニトリル/水/メタノール混合液 (5:3:2, v/v/v) を 1.0 mL/min で送液した⁶⁰⁾。試料溶液の注入量は 10 μ L とした。

【7】 溶出試験時の LF ラマン分光法によるモニタリング

溶出試験時の LF ラマン分光法によるモニタリングは下記の装置により行った。

【7-1】 溶出試験

溶出試験液は、第 17 改正日本薬局方における第二法に準拠した溶出試験第 2 液 (pH=6.8) を調製した。同様に調製した溶出試験第 2 液 (pH=6.8) に、ART の再結晶化の阻害を目的として HPMC を 1.0 w/v% になるように加えた溶液も調製した。

試験は第 17 改正日本薬局方におけるパドル法に準拠して行った。6 連式溶出試験機 DT 126 Light (ERWEKA GmbH.) に試験液を 500 mL 加えた。パドル回転数 150 rpm、温度 37°C とした。試験時にはサンプルを含むバスケットを先端に装着したラマンプローブを静かにベッセルに入れ、パドルブレードの上部 1 cm にバスケットの下端が配置されるように固定し、パ

ドルを回転させた。パドルの回転数は、ART の溶出速度が【6-2】溶出試験で示した通常の溶出試験と同じとなるよう回転数を検討し、50 rpm から 150 rpm へ変更した。

【7-2】LF ラマン分光法によるリアルタイムでのモニタリング

LF ラマン分光測定は以下の条件で行った。

装置	: RAMAN ALL-IN-ONE (MarqMetrix 社、米国)
測定プローブ	: TR-Probe (Coherent 社、米国)
励起レーザー波長	: 808 nm
レーザー出力	: 300 mW
露光時間	: 7 秒 (ART-2MRE) または 3 秒 (ART-RES)
積算回数	: 1 回
測定間隔	: 10 秒毎

【8】溶出試験時のベッセル底部の堆積サンプルの結晶状態評価

溶出試験時のベッセル底部の堆積サンプルの結晶状態評価は下記の装置により行った。

【8-1】溶出試験

溶出試験液は、第 17 改正日本薬局方における第二法に準拠した溶出試験第 2 液 (pH=6.8) を調製した。同様に調製した溶出試験第 2 液 (pH=6.8) に、ART の再結晶化の阻害を目的として HPMC を 1.0 w/v%になるように加えた溶液も調製した。

第 17 改正日本薬局方におけるパドル法に準拠して行った。6 連式溶出試験機 DT 126 Light (ERWEKA GmbH.) に試験液を 300 mL 加えた。パドル回転数 50 rpm、温度 37°Cでサンプルを加え、1、3、5、7.5、10、20、30、分でパドルを止め、測定を行った。

【8-2】 LF ラマン分光法

LF ラマン分光測定は以下の条件で行った。

装置	: RAMAN ALL-IN-ONE (MarqMetrix 社、米国)
測定プローブ	: TR-Probe (Coherent 社、米国)
励起レーザー波長	: 808 nm
レーザー出力	: 300 mW
露光時間	: 7 秒
積算回数	: 5 回

【8-3】 PXRD

PXRD 測定は以下の条件で行った。

装置	: Miniflex600 (株式会社リガク、東京)
測定範囲	: 5.0-35.0° (2θ)
測定速度	: 20.0°/min
ステップサイズ	: 0.02°/s
チューブ電圧および電流	: 40 kV/15 mA

第2章 CBZ 結晶多形の溶解及び結晶化過程のモニタリングの実験

【1】試薬

CBZ（化学純度 >97.0%、安定形 CBZ III）は東京化成工業株式会社（東京）から購入した。CBZ の準安定形である CBZ I は CBZ III を 170℃に設定したオーブンで 1 時間加熱することにより調製した⁶¹⁾。

メタノール（化学純度 >97.0%）は関東化学株式会社（東京）から購入したものを使用した。

【2】PXRD

PXRD 測定は以下の条件で行った。

装置	: Miniflex600（株式会社リガク、東京）
測定範囲	: 5.0-35.0° (2 θ)
測定速度	: 20.0°/min
ステップサイズ	: 0.02°/s
チューブ電圧および電流	: 40 kV/15 mA

【3】LF ラマン分光法

LF ラマン分光測定は以下の条件で行った。

装置	: RAMAN ALL-IN-ONE（MarqMetrix 社、米国）
測定プローブ	: TR-Probe（Coherent 社、米国）
励起レーザー波長	: 808 nm
レーザー出力	: 300 mW
露光時間	: 10 秒
積算回数	: 3 回
測定間隔	: 120 秒毎

【4】 晶析装置

溶解及び結晶化を確認するための晶析は以下の条件で行った。

装置	: Crystalline (Technobis 社、オランダ)
攪拌速度	: 800 rpm
昇温速度	: +2°C/min
降温速度	: -0.5°C/min
露光時間	: 10 秒
積算回数	: 3 回
画像取得間隔	: 5 分毎

【5】 検量データセット

検量データセットとして、メタノール中 CBZ 飽和溶液サンプル 3.5 mL を 1 つ、メタノール中 CBZ 飽和溶液サンプル 3.5 mL に 100 mg から 500 mg の範囲で 5 水準の CBZ I を添加した懸濁サンプル 5 つ、およびメタノール中 CBZ 飽和溶液サンプル 3.5 mL に 100 mg から 500 mg の範囲で 5 水準の CBZ III を添加した懸濁サンプル 5 つ、合計で 11 水準の濃度レベルのサンプルを調製した（表 5）。各濃度水準のサンプルは 3 回繰り返し、合計で 33 サンプルを調製した。

表 5 検量データセットの各結晶多形の非溶解 CBZ 量

No.	Repetitions	CBZ I	CBZ III
1	3	0 mg	0 mg
2	3	100 mg	0 mg
3	3	200 mg	0 mg

4	3	300 mg	0 mg
5	3	400 mg	0 mg
6	3	500 mg	0 mg
7	3	0 mg	100 mg
8	3	0 mg	200 mg
9	3	0 mg	300 mg
10	3	0 mg	400 mg
11	3	0 mg	500 mg

【6】バリデーションセット

検量モデルの予測性能を評価するために、12 サンプルのバリデーションセットを調製した。メタノール中 CBZ 飽和溶液サンプル 3.5 mL に 0 mg から 500 mg の範囲で 6 段階の CBZ I または CBZ III を添加して調製し、それぞれの結晶多形について 6 サンプルをバリデーションセットとして使用した（表 6 および表 7）。

表 6 CBZ I バリデーションセットの各結晶多形の非溶解 CBZ 量

No.	Repetitions	CBZ I	CBZ III
1	1	0 mg	0 mg
2	1	100 mg	0 mg
3	1	200 mg	0 mg
4	1	300 mg	0 mg
5	1	400 mg	0 mg
6	1	500 mg	0 mg

表 7 CBZ III バリデーションセットの各結晶多形の非溶解 CBZ 量

No.	Repetitions	CBZ I	CBZ III
1	1	0 mg	0 mg
2	1	0 mg	100 mg
3	1	0 mg	200 mg
4	1	0 mg	300 mg
5	1	0 mg	400 mg
6	1	0 mg	500 mg

【7】主成分分析

入力データとして検量データセットの 33 サンプルのラマンスペクトルを用いて、Solo+MIA (version 8.6.2, Eigenvector Research Inc, WA, USA) により解析した。PCA により、33 サンプルのスペクトルデータを 2 次元プロットとして表示することが可能である。ラマンスペクトルの前処理には SNV (standard normal variate) を適用した。

【8】検量モデルの構築

検量データセットの 33 サンプルのラマンスペクトルを用いて検量モデルを構築した。ラマンスペクトルの散乱強度を説明変数 X に、調製した検量モデルサンプルの各結晶多形の非溶解 CBZ 量を目的変数 Y とし、NIPALS (nonlinear iterative partial least squares) アルゴリズムに基づき、部分最小二乗回帰分析 (partial least squares regression: PLSR) を用いて検量モデルを構築した。PLSR は、ラマンスペクトルのような変数の数がサンプル数よりも多い高次元データを用いて検量モデルを構築する際に、一般的に使用される多変量解析の一種である。ラマンスペクトルの前処理と PLSR は、Solo+MIA (ver. 8.6.2, Eigenvector Research Inc, Manson, WA, USA) を使用

して実施した。検量モデルの予測性能指標として、決定係数 R^2 、root mean square error of calibration (RMSEC)、root-mean-square error of cross-validation (RMSECV)、及び root-mean-square error of prediction (RMSEP)を使用した。クロスバリデーションには、Venetian blinds cross-validation 法を使用した⁶²⁾。ラマンスpekトルの前処理には SNV、MSC、Savitzky-Golay 法による一次または二次微分を検討し、最終的には SNV を適用した。X 変数と Y 変数の両方について、mean-centering 処理を施した。なお RMSE は下のよう
に定義される。

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}}$$

$\hat{y}_i$ はラマンスpekトルによる非溶解 CBZ 量の予測値、 y_i は実際に調製した非溶解 CBZ 量、 n は予測に使用したサンプル数を示す。RMSEC は検量データセットの $\hat{y}_i$ と n を、RMSECV はクロスバリデーションの $\hat{y}_i$ と検量データセットの n を、RMSEP はバリデーションセットの $\hat{y}_i$ と n を使用して計算した。

引用文献

- 1) Makurvet, F. D. *Medicine in Drug Discovery* **9**, 100075 (2021).
- 2) Babu N. J., Nangia A., *Cryst. Growth Des.*, **11**, 2662-2679 (2011).
- 3) Di Maio S., Carrier R. L., *J. Control. Release*, **151**, 110-122 (2011).
- 4) Brittain H. G., *J. Pharm. Sci.*, **101**, 464-484 (2012).
- 5) Censi R., Martino P.D., *Molecules*, **20**, 18759-18776 (2015).
- 6) Hickey M. B., Peterson M. L., Scoppettuolo L. A., Morrisette S. L., Vetter A., Guzmán H., Remenar J. F., Zhang Z., Tawa M. D., Haley S., Zaworotko M. J., Almarsson Ö., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **67**, 112-119 (2007).
- 7) Kawakami K., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 480-495 (2012).
- 8) Stahly G. P., *Cryst. Growth Des.*, **7**, 1007-1026 (2007).
- 9) Strachan C. J., Rades T., Gordon K. C., Rantanen J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **59** (2), 179-192 (2007).
- 10) Larkin P. J., Dabros M., Sarsfield B., Chan E., Carriere J. T., Smith B. C., *Appl. Spectrosc.*, **68**, 758-765 (2014).
- 11) Gadade D. D., Pekamwar S. S., *Adv. Pharm. Bull.*, **6**, 479-494 (2016).
- 12) Aakeröy C. B., Salmon D. J., *CrystEngComm*, **7**, 439-448 (2005).
- 13) Shan N., Zaworotko M. J., *Drug Discov. Today*, **13**, 440-446 (2008).
- 14) Schluter N., Newman A., *Cryst. Growth Des.*, **9**, 2950-2967 (2009).
- 15) Good D. J., Rodríguez-Hornedo N., *Cryst. Growth Des.*, **9**, 2252-2264 (2009).
- 16) Karri S., Sharma S., Kaur G., *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **12**, 339-346 (2019).
- 17) Medhi B., Patyar S., Rao R. S., Byrav D. S. P., Prakash A., *Pharmacology*, **84**, 323-332 (2009).
- 18) Balint G. A., *Pharmacol. Ther.*, **90**, 261-265 (2001).
- 19) Benjamin J., Moore B., Lee S. T., Senn M., Griffin S., Lautu D., Salman S., Siba P., Mueller I., Davis T. M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 2465-2471 (2012).
- 20) Chaturvedi D., Goswami A., Saikia P. P., Barua N. C., Rao P. G., *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 435-454 (2010).
- 21) Ibrahim N., Ibrahim H., Sabater A. M., Mazier D., Valentin A., Nepveu F., *Int. J. Pharm.*, **495**, 671-679 (2015).
- 22) Karki S., Friščić T., Fábíán L., Jones W., *CrystEngComm*, **12**, 4038-4041 (2010).
- 23) Kaur M., Yardley V., Wang K., Masania J., Botana A., Arroo R. R., Li M., *Mol. Pharmaceutics*, **18**, 4256-4271 (2021).
- 24) Kaur M., Yardley V., Wang K., Masania J., Arroo R. R., Turner D. B., Li M.,

- Mol. Pharmaceutics*, **18**, 4272–4289 (2021).
- 25) Makadia J., Madu S. J., Arroo R., Seaton C. C., Li M., *CrystEngComm*, **24**, 1056–1067 (2022).
 - 26) Kuentz M., *J. Pharm. Pharmacol.*, **67**, 143–159 (2015).
 - 27) Gordon S., Naelapää K., Rantanen J., Selen A., Müllertz A., Østergaard J., *Pharm. Dev. Technol.*, **18**, 1407–1416 (2013).
 - 28) Østergaard J., Wu J. X., Naelapää K., Boetker J. P., Jensen H., Rantanen J., *J. Pharm. Sci.*, **103**, 1149–1156 (2014).
 - 29) Kazarian S. G., Ewing A. V., *Expert Opin. Drug Deliv.*, **10**, 1207–1221 (2013).
 - 30) Suzuki N., Fukui K., Otaka K., Suzuki T., Fukami T., *Chem. Pharm. Bull.*, **69**, 877–885 (2021).
 - 31) Julien P. A., Germann L. S., Titi H. M., Etter M., Dinnebier R. E., Sharma L., Baltrusaitis J., Frišćić T., *Chem. Sci.*, **11**, 2350–2355 (2020).
 - 32) Koskela J., Sutton J. J., Lipiäinen T., Gordon K. C., Strachan C. J., Fraser-Miller S. J., *Mol. Pharmaceutics*, **19**, 2316–2326 (2022).
 - 33) Qiao N., Wang K., Schlindwein W., Davies A., Li M., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **83**, 415–426 (2013).
 - 34) Tatsumi Y., Shimoyama Y., Kazarian S. G., *Mol. Pharm.*, **21**, 3233–3239 (2024).
 - 35) Yoshimura M., Miyake M., Kawato T., Bando M., Toda M., Kato Y., Fukami T., Ozeki T., *Cryst. Growth Des.*, **17**, 550–557 (2017).
 - 36) Alonzo D. E., Zhang G. G. Z., Zhou D., Gao Y., Taylor L. S., *Pharm. Res.*, **27**, 608–618 (2010).
 - 37) Chen J., Sarma B., Evans J. M. B., Myerson A. S., *Cryst. Growth Des.*, **11**, 887–895 (2011).
 - 38) Desiraju G. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 9952–9967 (2013).
 - 39) Wu H., Dong Z., Li H., Khan M., *Org. Process Res. Dev.*, **19**, 89–101 (2015).
 - 40) Bauer J., Spanton S., Henry R., Quick J., Dziki W., Porter W., Morris J., *Pharm. Res.*, **18**(6), 859–866 (2001).
 - 41) Blagden N., de Matas M., Gavan P. T., York P., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **59**(7), 617–630 (2007).
 - 42) Haleblan, J., McCrone, W., *J. Pharm. Sci.*, **58**, 911–929 (1969).
 - 43) Censi R., Di Martino P., *Molecules*, **20**, 18759–18777 (2015).
 - 44) Simon L. L., Pataki H., Marosi G., *et al.*, *Org. Process Res. Dev.*, **19**, 3–62 (2015).
 - 45) Shastri A., Dhumal K., Patil A., Sawant D., Hatolkar S., *J. ReAttach Ther.*

- Dev. Divers.*, **6**, 1963–1973 (2023).
- 46) Fevotte G., Calas J., Puel F., Hoff C., *Int. J. Pharm.*, **273**, 159–169 (2004).
 - 47) Grön H., Borissova A., Roberts K. J., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **42**, 198–206 (2003).
 - 48) Liotta V., Sabesan V., *Org. Process Res. Dev.*, **8**, 488–494 (2004).
 - 49) Fevotte G., *Chem. Eng. Res. Des.*, **85**, 906–920 (2007).
 - 50) Schaefer C., Lecomte C., Clicq D., Merschaert A., Norrant E., Fotiadu F., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **83**, 194–201 (2013).
 - 51) Chang C.-F., Wang S.-C., Shigeto S., *J. Phys. Chem. C*, **118**, 2702–2709 (2014).
 - 52) Hisada H., Okayama A., Hoshino T., Carriere J., Koide T., Yamamoto Y., Fukami T., *Chem. Pharm. Bull.*, **68**, 155–160 (2020).
 - 53) Remoto P. J. G. III, Bērziņš K., Fraser-Miller S. J., Korter T. M., Rades T., Rantanen J., Gordon K. C., *Pharmaceutics*, **15**, 1526 (2023).
 - 54) Suzuki N., Fukui K., Otaka K., Suzuki T., Fukami T., *Chem. Pharm. Bull.*, **69**, 877–885 (2021).
 - 55) Acevedo D., Yang X., Mohammad A., Pavurala N., Wu W.-L., O'Connor T. F., Nagy Z. K., Cruz C. N., *Org. Process Res. Dev.*, **22**, 156–165 (2018).
 - 56) Rinnan Å., van den Berg F., Engelsens S. B., *Trends Anal. Chem.*, **28**, 1201–1222 (2009).
 - 57) Tian F., Zeitler J. A., Strachan C. J., Saville D. J., Gordon K. C., Rades T., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **40**, 271–280 (2006).
 - 58) Farias M., Carneiro R., *Molecules*, **19**, 14128–14138 (2014).
 - 59) Chan K. L., Yuen K. H., Takayanagi H., Janadasa S., Peh K. K., *Phytochemistry*, **46**, 1209–1214 (1997).
 - 60) Lapkin A. A., Walker A., Sullivan N., Khambay B., Mlambo B., Chemat S., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49**, 908–915 (2009).
 - 61) O'Brien L. E., Timmins P., Williams A. C., York P., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **36**, 335–340 (2004).
 - 62) Rácz A., Bajusz D., Héberger K., *SAR QSAR Environ. Res.*, **32**, 661–674 (2018).

謝辞

本研究の遂行並びに本論文の作成にあたり、御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました、明治薬科大学分子製剤学研究室 深水啓朗教授に深く感謝の意を表します。

本学位論文作成に際し、御指導、御助言を賜りました主査の明治薬科大学 野地匡裕准教授、副査の下川健一准教授、宮嶋篤志講師に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えていただき、研究の期間、特段の御理解と御鞭撻を賜りました、武田薬品工業株式会社 アナリティカル・デベロップメント 池田幸弘シニアダイレクター、武田薬品工業株式会社 グローバルクオリティ光製薬品質部品質管理室 山本克彦室長に心より感謝申し上げます。

本研究の ART 共結晶の実験を遂行するにあたり、多くの支援をいただいた三浦宗一郎氏、Dr. Varin Titapiwatanakun、ならびに結晶構造解析を実施いただいた明治薬科大学 高取和彦教授に心より御礼申し上げます。また、CBZ の実験及び解析に際し、多くの支援をいただいた内田遥翔氏、明治薬科大学客員研究員 大橋令博士に心より御礼申し上げます。

最後に、大学院への進学を応援し支えとなってくれた家族に感謝いたします。

論文目録

本学位論文の内容は下記の論文に基づく。

1) Kudo T., Miura S., Takatori K., Titapiwatanakun V., Palanisamy V., Yamamoto K., Ikeda Y., Fukami T., Monitoring the dissolution behavior of novel pharmaceutical cocrystals consisting of antimalarial drug artemisinin with probe-type low-frequency Raman spectrometer. *Appl. Spectrosc.*, **78**, 1125–1135 (2024).

2) Kudo T., Uchida H., Yamato M., Ohashi R., Palanisamy V., Fukami T., *In-situ* monitoring of dissolution and crystallization processes of carbamazepine using low-frequency Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Chem. Pharm. Bull.*, **73**, 58–62 (2025).